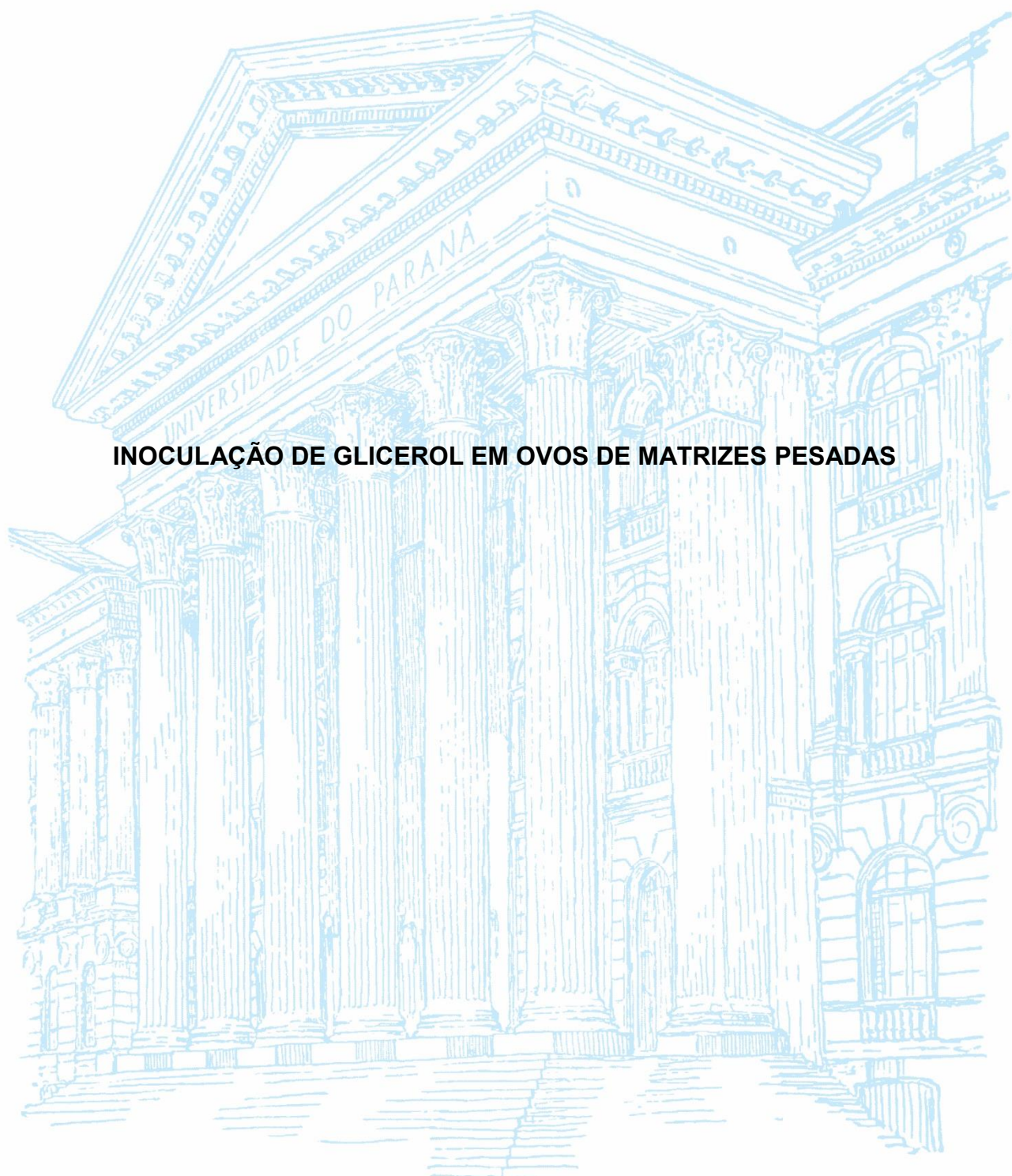


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA CARDOSO DAL PONT

INOCULAÇÃO DE GLICEROL EM OVOS DE MATRIZES PESADAS



CURITIBA

2018

GABRIELA CARDOSO DAL PONT

INOCULAÇÃO DE GLICEROL EM OVOS DE MATRIZES PESADAS

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Oliveira
Co-orientadora: Prof Dra. Chayane da Rocha

CURITIBA

2018

D149 Dal Pont, Gabriela Cardoso
Inoculação de glicerol em ovos de matrizes pesadas / Gabriela
Cardoso Dal Pont. - Curitiba: 2018.
90 f.: il., grafs.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Gisele de Oliveira
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias.

1. Ovos - Eclodibilidade. 2. Ovos - Incubação. 3. Frango de corte
- Embrião - Nutrição. 4. Glicogenio. I. Oliveira, Simone Gisele de.
II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU 636.5.033



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

ATA N° 09

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS.**

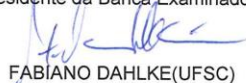
No dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e dezoito às 09 horas, na sala Anfiteatro, do Hospital Veterinário do Setor de SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da Mestranda **GABRIELA CARDOSO DAL PONT** para a Defesa Pública de sua Dissertação de Mestrado intitulada: **INOCULAÇÃO DE GLICEROL EM OVOS DE MATRIZES DE FRANGO DE CORTE**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de PósGraduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **SIMONE GISELE DE OLIVEIRA(UFPR)**, **ANA VITORIA FISCHER DA SILVA(UFPR)**, **FABIANO DAHLKE(UFSC)**. Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a(o) discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela Aprovação da aluna. A Mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de Mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **SIMONE GISELE DE OLIVEIRA**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Observações: mudança de título para:
Inoculação de glicerol em ovos de matrizes
pebadas

Curitiba, 27 de Fevereiro de 2018.



SIMONE GISELE DE OLIVEIRA(UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


FABIANO DAHLKE(UFSC)


ANA VITORIA FISCHER DA SILVA(UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **GABRIELA CARDOSO DAL PONT** intitulada: **INOCULAÇÃO DE GLICEROL EM OVOS DE MATRIZES DE FRANGO DE CORTE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Fevereiro de 2018.


SIMONE GISELE DE OLIVEIRA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


ANA VITORIA FISCHER DA SILVA

Avaliador Externo (UFPR)


FABIANO DAHLKE

Avaliador Externo (UFSC)

Dedico:

A Deus e todas os guias de luz que me auxiliaram na trajetória e
conquista deste sonho.

A minha família, ao meu pai e minha mãe pois sem o apoio incondicional,
ensinamentos de garra e resiliência eu não seria quem sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Foram dois anos muito intensos, com batalhas e desafios que pareciam enormes, e alegrias e realizações igualmente intensas. Durante esse período contei com inúmeros auxílios, materiais, espirituais, de energia, ombro amigo, palavras de consolo e encorajamento e para todos esses seres que me auxiliaram eu venho expressar minha gratidão que nunca será suficiente em palavras.

Agradeço a Deus, os espíritos de luz, meus entes queridos e todos aqueles que me passaram boas energias, aconselharam, me protegeram, deram forças, sabedoria e determinação para concluir esse sonho. A Deus sou grata por todo caminho que me permitiu trilhar, pelo crescimento intelectual, emocional e maturidade adquirida.

Agradeço a minha família, base da minha vida. Aos meus pais toda gratidão por me mostrarem a importância do conhecimento, me apoiarem incondicionalmente em todos meus sonhos, fazendo tudo o que podiam para que se tornassem realidade. Ao meu irmão agradeço pelos momentos compartilhados e de desabafos.

Agradeço a Universidade Federal do Paraná por me acolher como filha esses sete anos, me proporcionando ensinamentos técnicos, mas sobretudo éticos e morais. Obrigada a CAPES pela bolsa concedida, e a NU3 pelo financiamento dessa pesquisa.

Aos professores envolvidos, Prof. Alex por todo conhecimento, paciência, conselhos profissionais e pessoais; a Prof^a Simone pela paciência e disposição; a Prof^a Chay por todo conhecimento sobre a nutrição *in ovo*, acreditar no nosso potencial para iniciar essa linha de pesquisa e todas conversas sobre a vida; ao Prof. João Scandolera por toda ajuda na reforma do incubatório.

A todos integrantes do LEPNAN um enorme agradecimento pela ajuda no trabalho braçal e intelectual, conselhos, desabafos e convivência, mas também por todos momentos de alegria e amizade. Agradeço ao pessoal dos frangos e suínos Andréia, Vinicius, Lucas, Jean, Kariny, Manu, Priscila, Felipe, Josi, Leopoldo, Thiagão, Fran, Thiago, aos inúmeros estagiários que ajudaram durante esse período, especialmente Rosi, Vitor, Bassi, Isa, Geovani, Luiz, Alex, Wlad e Barbara e as “meninas do LENUCAN”.

Aos profissionais do Laboratório de Nutrição Animal, especialmente Hair pela paciência e ajuda, e Cleusa pelos ensinamentos e conversas.

A pessoas muito especiais na minha vida, que me suportaram nos momentos de estresse e desespero, me apoiando, trazendo momentos felizes e por toda amizade: Marena, Paulinha, Eryka, Camila, Thaís, Ricardo, Bia, Laiz, Bruna, Paula, André, Gabi, Manu, Bel, Luiza.

A todos que direta e indiretamente contribuíram nesse trabalho e nos últimos dois anos, muito obrigada!

“Todo progresso acontece fora da zona de conforto”

(Michael John Bobak)

RESUMO

O desenvolvimento embrionário dos frangos de corte é influenciado pelos nutrientes depositados no ovo, sendo que ovos pequenos produzem pintinhos mais leves. Com a hidrólise dos triglicerídeos da gema há liberação de glicerol o qual é utilizado pelo embrião como principal substrato para formação de glicogênio hepático. Sendo assim, o glicerol parece ser um composto promissor para utilização na nutrição *in ovo* ou *in ovo feeding* (IOF), possibilitando elevar a reserva energética do embrião. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da inoculação do glicerol em ovos com pesos distintos produzidos por matrizes pesadas de diferentes idades. Também, buscou-se avaliar a influência do dia de inoculação do glicerol. Para tanto, foram realizados três experimentos, os quais avaliaram eclodibilidade, parâmetros de incubação, deposição de glicogênio e desempenho zootécnico de frangos de corte aos 7 dias de idade. Para o primeiro experimento foram utilizados 672 ovos de matrizes de 32 semanas de idade da linhagem Ross®, os ovos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x3 (2 pesos de ovo x 3 doses de glicerol), totalizando seis tratamentos com 8 repetições de 14 ovos cada. O segundo experimento foi idêntico ao primeiro diferindo apenas pela idade das reprodutoras, sendo utilizado 672 ovos de matrizes pesadas com 60 semanas de idade. Para o terceiro experimento, em que foi avaliado o efeito do dia da IOF, foram utilizados 336 ovos leves (55,6 a 58,6g) provenientes de matrizes pesadas com 32 semanas. Os ovos foram distribuídos ao acaso em três tratamentos com 8 repetições de 14 ovos cada. Os tratamentos consistiram em inoculação de solução fisiológica ou solução com 6mg/ml de glicerol aos 17 dias e 6mg/ml de glicerol aos 18 dias. Nos três experimentos a inoculação do glicerol não influenciou a eclodibilidade, período de morte embrionária ou nascimento precoce. A inoculação de 6mg/ml de glicerol em ovos pesados no primeiro experimento aumentou as reservas de glicogênio hepático dos pintinhos após a eclosão ($P<0,05$), e no segundo experimento resultou em aumento no peso do fígado ($P<0,01$). Os pintinhos de reprodutoras de 32 semanas submetidos a inoculação de glicerol apresentaram maiores consumo de ração (CRM) ($P<0,001$) e ganho de peso (GPM) ($P<0,01$) aos 7 dias de idade. No entanto, o desempenho zootécnico dos pintinhos de ovos de galinhas mais velhas não foi influenciado pela IOF. No terceiro experimento o peso dos pintinhos à eclosão não foi influenciado pela IOF, no entanto, os pintinhos que receberam glicerol *in ovo* apresentaram maior absorção da gema ($P<0,05$). A inoculação de 6mg/ml de glicerol aos E18 aumentou as reservas de glicogênio hepático dos pintinhos ($P=0,001$) e promoveu maiores CRM e GPM ($P<0,05$) aos 7d em relação ao tratamento controle. Assim, o glicerol parece promissor como ingrediente para uso na nutrição *in ovo* contribuindo para a formação de reservas de glicogênio pelo pintinho e melhorando o desempenho na primeira semana pós-eclosão. Em ovos de matrizes jovens o glicerol propiciou melhora no desempenho e mostrou ser mais vantajoso quando aplicado aos 18 dias de incubação.

Palavras-chave: eclosão, embrião, glicerol, glicogênio, incubatório, nutrição *in ovo*.

ABSTRACT

Embryonic development of broilers depending on egg nutrients, once small eggs produce light chickens. Hydrolysis of yolk triglycerides releases glycerol, which is used as a mainly source to liver glycogen by the embryo. Therefore, the glycerol seems interesting to *in ovo* feeding (IOF) to improve the chicken embryo energetic stock. This study aimed to evaluate the effects of IOF of glycerol in eggs from different sizes and broiler breeders age. The study also evaluates the influence of the inoculation day. For this purpose, three trials were performed, which evaluated hatchability, incubation parameters, glycogen reserves and broiler performance at 7 days old. The first test used 672 eggs from Ross® breeders with 32 weeks of age, these eggs were randomly distributed in a factorially 2x3 arranged (2 egg weight x 3 glycerol solutions) compound 6 treatments with 8 replicates of 14 eggs each. The second trial was equal the first besides hens age, and to it 672 eggs from 60 weeks old broiler breeders were used. The third trial, which evaluate the day of IOF, was conducted with 336 light eggs (55,6 up to 58,6g) from breeders with 32 weeks. The eggs were randomly distributed in 3 treatments, 8 replicates of 14 eggs each. The treatments were: injection of control solution at 17th day of embryonic development (E17), and IOF of 6mg/ml of glycerol at E17 and E18. The three trials did not show effect of glycerol inoculation on hatchability, embryonic death period or early hatch. Injection of 6mg/ml of glycerol in heavy eggs in Trial I increased liver glycogen of chickens at hatch ($P<0,05$), and in the second trial the same dosage enhanced liver weight ($P<0,01$). The chickens from 32 wk-old breeders inoculated with glycerol showed higher feed intake (FI) ($P<0,001$) and body weight gain (BWG) ($P<0,01$). However, the performance of older breeders offspring was not influenced by glycerol IOF. The third trial did not show effect of IOF on weight at hatch, although, the treatments which received glycerol showed higher yolk sac utilization ($P<0,05$). Inject 6mg/ml of glycerol at E18 increased liver glycogen at hatch ($P=0,001$), as well as improved FI and BWG ($P<0,005$) than control at 7d-old. Accordingly, the glycerol seems a promising ingredient to *in ovo* nutrition, once it contributes to increase glycogen reserves and performance at first week. Glycerol enhanced performance of young breeders offspring and seems to be more beneficial when inoculated at 18th d of embryonic development.

Key-words: embryo, glycerol, glycogen, hatch, hatchery, *in ovo* nutrition.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. EMBRIÃO E SEUS ANEXOS EMBRIONÁRIOS.....	19
FIGURA 2. ENTRADA DO GLICEROL NA VIA GLICOLÍTICA.	26
FIGURA 3. CONTRIBUIÇÃO (% DE FLUXO) DO GLICEROL SÉRICA PARA SÍNTESE DE ALANINA, ASPARTATO E GLUTAMATO NO FÍGADO DE EMBRIÕES COM 14 E 19 DIAS DE DESENVOLVIMENTO (E14 E E19 RESPECTIVAMENTE), SUBMETIDOS A 8H DE INFUSÃO CONTINUA DE [$^{13}\text{C}_3$] GLICEROL (* P<0.05)....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos experimentais.....	51
Tabela 2. Medianas da Eclodibilidade (%) e Peso de Pintinhos (g) ao nascimento oriundos de ovos de matrizes com 32 semanas inoculados com glicerol.	54
Tabela 3. Peso de Gema Residual (g), Peso de Fígado (g), Glicogênio hepático (mg/g), e Glicogênio no Músculo do Peito (mg/g) de pintinhos ao nascimento oriundos de ovos de matrizes com 32 semanas inoculados com glicerol.	54
Tabela 4. Peso de Peito (g), Peso de Fígado (g), Consumo Médio de Ração (CMR, g), Ganho de Peso Médio (GPM, g) e Conversão Alimentar (CA, g) de frangos de corte com 7 dias nascidos de ovos de matrizes com 32 semanas inoculados com glicerol.	55
Tabela 5. Medianas da Eclodibilidade (%) e Peso de Pintinhos ao nascimento oriundos de ovos de matrizes com 60 semanas inoculados com glicerol.	56
Tabela 6. Peso de Gema Residual (g), Peso de Fígado (g), Glicogênio hepático (mg/g) e Glicogênio no Músculo do Peito (mg/g) de pintinhos ao nascimento oriundos de ovos de matrizes com 60 semanas inoculados com glicerol.	56
Tabela 7. Peso de Peito (g), Relação de Peito (%), Peso de Fígado (g), Consumo Médio de Ração (CMR, g), Ganho de Peso Médio (GPM, g) e Conversão Alimentar (CA) de frangos de corte com 7 dias de idade nascidos de ovos de matrizes de 60 semanas inoculados com diferentes níveis de glicerol.....	57
Tabela 8. Tratamentos Experimentais	70
Tabela 9. Eclodibilidade de ovos inoculados com glicerol em diferentes períodos de desenvolvimento embrionário.....	73
Tabela 10. Peso (g), Peso sem saco da gema (g), Peso de Gema (g), Peso de Fígado (g), Glicogênio hepático e muscular (mg/g de tecido) de pintinhos ao nascimento oriundos de ovos inoculados com glicerol em diferentes períodos de desenvolvimento embrionário.	73
Tabela 11. Consumo de Ração Médio (CRM), Ganho de Peso Médio (GPM) e Conversão Alimentar (CA) de pintinhos aos 7 dias de idade oriundos de ovos inoculados com glicerol em diferentes períodos de desenvolvimento embrionário. ...	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	- Adenosina 3',5'-monofosfato
AMPK	- Proteína Quinase ativada por AMP
ANOVA	- Análise de Variância
ATP	- Adenosina Tri Fosfato
CA	- Conversão Alimentar
CEUA SCA	- Comissão de Ética no Uso de Animais Setor de Ciências Agrárias
CMR	- Consumo Médio de Ração
E14	- 14º dia de desenvolvimento embrionário
EUA	- Estados Unidos da América
g	- gramas
GK	-Glicerol Quinase
GPM	- Ganho de Peso Médio
HMB	- hidroximetilbutirato
IOF	- in ovo feeding
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada
m	- metros
MAPA	- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
mg	- miligramas
ml	- mililitros
mmol	- milimolar
mOsm	- miliosmol
Oms	- Osmolar
T3	- Tri-iodotironina
T4	- Tiroxina
TGI	- Trato Gastrointestinal

LISTA DE SÍMBOLOS

@ - arroba

α - alfa

β – beta

μ - micro

® - marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
Capítulo 1	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. ANATOMIA DO OVO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	18
2.2. METABOLISMO ENERGÉTICO DO EMBRIÃO DE FRANGO	20
2.3. NUTRIÇÃO <i>IN OVO</i> E INGREDIENTES	23
2.4. GLICEROL	25
2.5. GLICEROL NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE.....	27
2.6. GLICEROL NA NUTRIÇÃO <i>IN OVO</i>	30
2.7. DIFERENÇA ENTRE OVOS DE MATRIZES DE IDADES DIFERENTES	32
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
Capítulo 2	46
4.1. PERIÓDICO PRETENDIDO	46
4.2. CLASSIFICAÇÃO QUALIS PERIÓDICOS	46
GLICEROL <i>IN OVO</i> AFETA O ESTOQUE DE GLICOGÊNIO E O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE	47
Capítulo 3	66
5.1. PERIÓDICO PRETENDIDO	66
5.2. CLASSIFICAÇÃO QUALIS PERIÓDICOS	66
INOCULAÇÃO DE GLICEROL EM OVOS DE MATRIZES PESADAS JOVENS EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO	67
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
7. REFERÊNCIAS.....	80

1. INTRODUÇÃO

Nas espécies ovíparas o desenvolvimento embrionário é dependente dos nutrientes e particularidades do ovo, tal como fatores físicos da incubação. Uma vez que o crescimento das atuais linhagens de frango de corte está muito mais rápido as exigências nutricionais também aumentaram, no entanto, não houve aumento na mesma escala dos nutrientes depositados no albúmen e gema. Assim, com o intuito de aumentar o aporte nutricional do embrião, para que este expresse seu potencial genético, e produzir melhores pintinhos à eclosão desenvolveu-se a técnica da nutrição *in ovo*.

A inoculação de substâncias no ovo e sua utilização pelo embrião vem sendo estudada com finalidade de aplicação comercial nas duas ultimas décadas, demonstrando resultados interessantes dependendo da substância inoculada. Durante o desenvolvimento embrionário a ave apresenta o metabolismo diferente do período pós-eclosão. Sendo que, no terço final de incubação o glicerol oriundo dos lipídios da gema é o maior precursor de glicose, glicogênio e aminoácidos não essenciais (Sunny e Bequete, 2011). Portanto, o glicerol mostra-se uma substância com potencial para a utilização *in ovo*, sendo um possível substrato para aumentar as reservas de glicose, glicogênio hepático e muscular.

Contudo, no sistema produtivo, quando avaliadas reprodutoras de diferentes idades há grande diferença entre os ovos, principalmente em tamanho e características físicas. Matrizes mais novas tendem a fazer postura de ovos menores, com menor proporção de gema, casca e albúmen mais espesso, o que dificulta a oxigenação do embrião. Enquanto, que as aves mais velhas produzem ovos maiores, com gemas maiores, e casca mais porosa (Vieira e Moran, 1998). Consequentemente, observa-se diferença, principalmente em peso corporal, de pintinhos oriundos de ovos maiores, daqueles de ovos menores. No entanto, não há consenso se a diferença se deve ao tamanho dos ovos ou está mais relacionado a idade da matriz.

A nutrição *in ovo* de glicerol pode apresentar benefícios, principalmente em ovos menores e de matrizes jovens, devido à condição de menor quantidade de triglicerídeos e de dificuldade de oxigenação do embrião nesses ovos, gerando pintinhos mais pesados e uniformes.

Assim, o objetivo desse trabalho foi retratar os principais achados sobre glicerol na nutrição *in ovo* e os fatores envolvidos, e avaliar através de três ensaios experimentais o efeito da inoculação do glicerol em ovos leves e pesados de frangos oriundos de matrizes de diferentes idades, tal como o efeito do dia de inoculação da substância sobre incubação, reservas de glicogênio e desempenho de frangos de corte.

Capítulo 1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANATOMIA DO OVO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O ovo é um sistema complexo o qual abriga e proporciona desenvolvimento do blastodisco até pintinho e para tal é imprescindível que todas suas estruturas, como gema, chalaza, albúmen, membrana da casca, casca e cutícula estejam íntegras e que o desenvolvimento das membranas extraembrionárias ocorra corretamente.

A casca do ovo, além de configurar uma barreira mecânica contra a entrada de microorganismos, é importante no controle da troca de gases pelos seus poros, e fornece o cálcio necessário para o desenvolvimento do embrião (Alcroft, 1964). A casca, ainda conta com um fino revestimento externo, a cutícula, e duas membranas semipermeáveis em sua face interna. Com o resfriamento do ovo após a postura a membrana interna retrai formando a câmara de ar na extremidade mais larga do ovo, onde se concentram as trocas gasosas entre embrião e ambiente externo.

Abaixo das membranas da casca encontra-se o albúmen, composto de aproximadamente 88% de água e 75% de proteína na sua matéria seca (Davis e Reeves, 2002). O albúmen fornece água, minerais e aminoácidos ao embrião, além, de proteger das infecções microbianas e auxiliar na inércia térmica do ovo (Sturkie, 1998). No centro do ovo, sustentada pela chalaza, encontra-se a gema, composta de lipídios envoltos pela membrana vitelínica, é a principal fonte energética para o desenvolvimento do embrião, e é nela que se localiza o blastodisco após a fertilização.

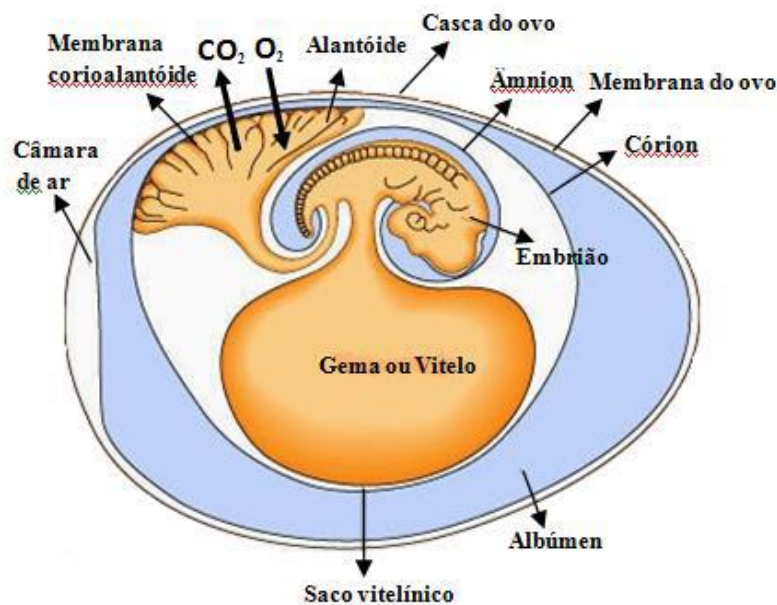
Com a incubação do ovo, há a formação dos anexos embrionários: saco vitelino, alantóide, âminon e córion a partir dos três folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme) (Barbosa, 2011). Os anexos embrionários são essenciais para o desenvolvimento do embrião. O saco vitelino se forma a partir de 48 horas de incubação, e é uma extensão do intestino médio sobre a gema. Altamente vascularizado esse anexo exerce a função de órgão nutricional extraembrionário, atuando como tecido digestivo e de absorção, e, também, realiza síntese de proteínas específicas, aminoácidos e sangue (Freeman e Vince, 1974). As células endodérmicas que recobrem a gema secretam enzimas que fragmentam os grânulos

de gordura possibilitando sua absorção e transporte pelas veias vitelinas ao embrião (Barbosa, 2011). No terço final da incubação, a gema é internalizada na cavidade abdominal caracterizando a reserva nutritiva do embrião por cerca de 48h após a eclosão (Gonçalves et al., 2013).

O alantóide é formado a partir das 60 horas de incubação como uma projeção do intestino grosso, e com o desenvolvimento embrionário se une ao córion, membrana que circunda o embrião (Deeming, 2002). A membrana corioalantóide é responsável pelo equilíbrio ácido-base e trocas gasosas, reabsorção de água e eletrólitos, transporte de cálcio da casca para o embrião e armazenamento dos resíduos excretados pelos rins (Barbosa, 2011; Gabrielli e Accili, 2010).

O embrião é envolto diretamente por uma cavidade cheia de líquido salino, o âmnion, o qual evita a sua desidratação, isola das oscilações de temperatura, protege contra choques mecânicos e evita aderências do embrião a outras membranas (Romanoff, 1960).

FIGURA 1. EMBRIÃO E SEUS ANEXOS EMBRIONÁRIOS



FONTE: Macari et al. (2013).

2.2. METABOLISMO ENERGÉTICO DO EMBRIÃO DE FRANGO

O frango de corte durante seu desenvolvimento embrionário e após a eclosão passa por mudanças em seu metabolismo energético. Até o quarto dia de desenvolvimento embrionário o embrião ainda não está apto a realizar trocas gasosas de maneira eficiente, sendo a glicose o substrato para fornecimento de energia pelo metabolismo anaeróbico e maior responsável pelo desenvolvimento do embrião (Moran, 2007). Após a formação e amadurecimento da membrana corioalantóide, por volta do 5º dia de incubação, o O₂ se torna acessível e o embrião utiliza os ácidos graxos presentes na gema como principal fonte energética, por meio da betaoxidação (Moran, 2007; Sunny e Bequette, 2011).

A glicose está presente em pequenas quantidades no ovo, menos que 3% da sua matéria seca (Romanoff, 1960), no entanto, ela é essencial para suprimento energético do cérebro e do sistema imune (Humphery e Rudrappa, 2008) durante o período pré-eclosão até que ocorra o estabelecimento de respiração pulmonar eficiente. A partir do 13º dia de incubação há aumento da demanda por glicose devido ao grande crescimento do embrião, acarretando aumento na gliconeogenese e glicogênese (Pearce, 1977; Picardo e Dickson, 1982). Esse incremento é observado pela atividade aumentada das enzimas gliconeogênicas, piruvato carboxilase, fosfopiruvato carboxilase, hexosedifosfatase e glicose-6-fosfatase, chegando ao pico aos 17º de desenvolvimento embrionário (Zhai et al., 2011). Após esse período, para que o embrião consiga armazenar quantidade suficiente de glicogênio no fígado, enzimas como uridina difosfaglicose α -glucan glicosil transferase, glicose-1-fosfatase uridil transferase e fosfoglicomutase aumentam chegando ao máximo no 19º dia de incubação (Ballard e Oliver, 1963; Pearce, 1971).

O fígado é identificado como o maior responsável pela homeostase da glicemia no embrião de frangos de corte (Ballard e Oliver, 1963). O órgão é envolvido na gliconeogenese, glicogênese e glicogenólise, e nele é armazenado o glicogênio que pode ser mobilizado para o restante do corpo para a suprimento de energia. A partir do sexto dia de incubação inicia-se a estocagem de glicogênio no fígado (Hazelwood, 1971), sendo o pico de produção e deposição aos 19 dias de incubação (Hu et al., 2016). O glicogênio depositado é produzido a partir de substratos ricos em carbono, como glicerol, oriundo da quebra dos triglicerídeos da gema, proteínas do tecido

muscular, as glicoproteínas do líquido amniótico que são absorvidas e outros carboidratos (Oliveira et al., 2008). Assim, a dosagem de glicogênio hepático é considerada uma forma de mensurar o status energético do embrião (Christensen et al., 2001; Uni et al., 2005).

Durante os últimos dias de incubação há grande demanda de energia pelo embrião. No entanto, é nesse período, também, que ocorre a transição de respiração corioalantóide para pulmonar e a disponibilidade de oxigênio é baixa, reduzindo a utilização de ácidos graxos para produção de energia (Moran 2007). O embrião, então, usufrui de glicólise anaeróbia novamente (Bjonnes et al., 1987; Hoiby et al., 1987; John et al., 1986) usando principalmente o glicogênio.

Além do fígado, o músculo peitoral tem papel importante na estocagem de glicogênio, pois apesar de armazenar uma proporção menor de carboidratos, corresponde a maior reserva corporal de glicogênio do embrião (John et al., 1988; Christensen et al., 2001; Uni et al., 2005; Foye et al., 2006), e é importante fonte de energia nos últimos dias antes da eclosão (Oliveira et al., 2008). Contudo, uma vez que as células musculares não possuem glicose-6-fosfatase, e não conseguem exportar glicose para outros tecidos, essas reservas são utilizadas somente pelo próprio músculo (Krebs, 1972; Oliveira et al., 2008). Ainda, se as reservas de carboidratos são esgotadas, o músculo do peito é a principal fonte de aminoácidos para gliconeogênese (Donaldson 1995; Keirs et al., 2002; Warner et al., 2006).

A utilização da glicólise como fonte energética gera 2 piruvatos e 6 moléculas de ATP para cada glicose reduzida. Contudo, a baixa quantidade de oxigênio impossibilita que o piruvato seja oxidado produzindo mais ATP (Matthews e Holde, 1990), e no final da incubação o piruvato é convertido em lactato. Quando oxigênio está disponível, as aves conseguem reciclar no fígado o piruvato em glicose pelo Ciclo de Cori, assim com o estabelecimento da respiração pulmonar, após o nascimento, o pintinho é capaz de transformar o lactato armazenado em glicose (Pearce e Brown, 1971; Christensen et al., 2003).

Alguns autores associam a reserva de glicogênio ao maior peso na eclosão (John et al., 1988; Christensen et al., 2001), uma vez que, maiores reservas do carboidrato evitam o uso de aminoácidos musculares para geração de energia (Uni et al., 2005). Devido a realização da glicólise, as reservas de glicogênio hepático e muscular ficam muito baixas após o nascimento, e tendem a se reestabelecerem

quando os pintainhos conseguem oxigenação eficiente pelos pulmões, voltando a utilizar dos lipídios do saco da gema (Christensen et al., 2001), e também após se alimentarem e utilizarem de fontes dietéticas de glicose (Vieira e Moran, 1999a; Vieira e Moran, 1999b).

Durante os 21 dias de incubação o embrião do frango precisa se desenvolver e crescer se tornando apto a vida externa. Dentro desse curto tempo é observado que o período do 14º dia de vida embrionária (E14) até o 19º é o mais crítico para o embrião, nessa fase a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) hepática está em maior atividade o que vem acompanhado do aumento no consumo de oxigênio, ocorrem, também, mudanças hormonais, como o aumento da relação insulina:glucagon, e o aumento da estocagem de glicogênio (Pearce, 1977; Tazawa et al., 1992; Lu et al., 2007; Hu et al., 2013). Ainda, nesse período o padrão de utilização de glicose e glicerol também muda provavelmente com o objetivo de preservar a glicose para formação de glicogênio e utilizar o glicerol da gema. Hu et al. (2016) observaram que a conversão da glicose em: glicose sérica, glicogênio hepático, alanina, aspartato e glutamina foi maior com 14 que com 19 dias de desenvolvimento embrionário. No entanto, no mesmo estudo foi observado que o glicerol é mais utilizado para produção de glicose e aminoácidos aos 19 dias. Isso reafirma as mudanças nas vias metabólicas do embrião no decorrer do seu desenvolvimento, mostrando que ele está mais hábil a metabolizar o glicerol no terço final do desenvolvimento embrionário, enquanto que aos 14 dias suas vias metabólicas são mais eficientes na metabolização da glicose.

Os processos de glicogênese e glicogenólise já foram observados também no saco da gema (Thommes e Just, 1964; Willier, 1968; Yadgary e Uni, 2012) fazendo do saco vitelínico uma estrutura de armazenagem de glicogênio extra-corpórea. Yadgary e Uni (2012) observaram que a produção de glicogênio pelo saco da gema apresenta padrão similar a do fígado, porém como a gema chega a pesar 20 a 50 vezes mais que o fígado, sua capacidade de estocagem também é maior sendo capaz de transferir 10 vezes mais glicose gerada a partir da quebra do glicogênio que o fígado. No mesmo trabalho, a presença de glicerol quinase e sua expressão gênica no saco da gema indicam que o glicogênio foi formado a partir de aminoácidos e glicerol. Dessa forma, os autores acreditam que durante a última semana de

desenvolvimento intra ovo o saco da gema fornece a maioria dos nutrientes para o embrião, superando o fígado.

2.3. NUTRIÇÃO *IN OVO* E INGREDIENTES

Com a seleção genética e o acelerado crescimento dos frangos de corte houve aumento das exigências metabólicas, incluindo o período de desenvolvimento embrionário. Segundo Santos et al. (2007), as altas exigências nutricionais dos embriões das atuais linhagens talvez não sejam atendidas pelo conteúdo presente no ovo, uma vez que as aves possuem o desenvolvimento embrionário completamente dependente dos nutrientes e das características do ovo e o aumento da deposição de nutrientes pelas matrizes não acompanhou a seleção por crescimento rápido. Também, para que os animais consigam utilizar eficientemente a dieta fornecida e alcançar seu potencial genético, é essencial o completo desenvolvimento e maturidade do trato gastrointestinal (TGI) ao nascimento. Embora a ingestão do alimento após a eclosão seja responsável por grande parte do estímulo para crescimento das vilosidades e produção do perfil enzimático (Uni e Ferket, 2004), trabalhos já mostraram que mesmo antes da eclosão há produção e secreção enzimática (Marchaim e Kulka, 1967; Moran, 1985). Visto isso, como alternativa para aumentar os nutrientes disponíveis ao embrião e antecipar sua maturidade digestiva iniciou-se as pesquisas de nutrição intra ovo.

A inoculação de substâncias nos ovos embrionados é a forma de fornecimento de alimento o mais cedo possível para as aves, e seus primeiros testes foram realizados por Al-Murrani em 1982, com a injeção no saco vitelínico de uma mistura de aminoácidos semelhante ao perfil de aminoácidos do ovo. O autor observou aumento no peso vivo à eclosão, resultado que se manteve até os 56 dias de idade das aves. Buscando outras vias de nutrição embrionária Ohta et al. (1999) avaliou a inoculação de aminoácidos no saco vitelínico e na câmara de ar, e observou que a inoculação na câmara teve efeito negativo sobre a eclodibilidade.

Devido a pressão causada pelo crescimento do feto, por volta do 14º e 15º dia de incubação, abre-se uma ligação entre os compartimentos do albúmen e do âmnion, chamada conexão sero-amniótica, por onde o albúmen atravessa o saco amniótico sendo incorporado ao âmnion. É nesse período, também, que o embrião inicia a

deglutição do líquido no qual está envolto (Everaert e Decuypere, 2013). Ao passar pelo trato gastrointestinal as glicoproteínas do albúmen presentes no líquido são absorvidas, sendo seus carboidratos utilizados para gliconeogênese e os aminoácidos para síntese de proteínas (Muramatsu, 1990). Ainda, a passagem dos nutrientes estimula a maturação digestiva do embrião (Striguini, 2015).

A partir de 2000, os pesquisadores Uni e Ferket (2004) aperfeiçoaram a técnica da nutrição *in ovo* tendo como base o consumo do líquido amniótico pelo embrião das aves. Os pesquisadores observaram que a melhor fase para injeção da solução é próxima ao 18º dia de incubação e o melhor local seria o saco amniótico. Os estudos geraram a patente da técnica para os pesquisadores- 2003 Patente EUA # 6.592.878 B2 “Melhoramento do desenvolvimento de espécies ovíparas por meio da nutrição *in ovo*”.

A passagem do líquido amniótico com a solução nutritiva inoculada pode auxiliar na maturação dos processos intestinais de tal forma, que segundo Uni et al. (2003) o TGI de uma ave recém eclodida recebendo substâncias específicas *in ovo* apresenta atividade funcional semelhante a de uma ave sem inoculação aos 2 dias de idade. Segundo Tako et al. (2004), a administração de nutrientes no âmnion estimula o desenvolvimento intestinal, com o aumento de comprimento dos vilos e digestão de dissacarídeos. Nesse mesmo trabalho, os autores observaram aumento de 45% na altura dos vilos do jejuno com a inoculação de hidroximetilbutirato (HMB) *in ovo*, e de 33% nos tratamentos inoculados com uma mistura de carboidratos e HMB. Uni e Ferket (2004) observaram, que a inoculação *in ovo* de 1 ml de solução salina contendo carboidratos aos 18 dias de incubação aumentou mais de 45% a altura dos vilos no jejuno após 48 horas da injeção.

Entretanto, há muitas variações de resultados de acordo com os nutrientes inoculados nos ovos e sua função no metabolismo, que podem variar de catabolismo e anabolismo proteico (HMB e aminoácidos: metionina, lisina, treonina, arginina e leucina), fonte energética (sacarose, dextrina, maltose e glicose), ativação do sistema imunológico (vitamina E, cobre e probióticos), e/ou ação trófica da mucosa intestinal (glutamina, zinco e ácido butírico). Os detentores da primeira patente afirmam que a solução ideal deve ser composta por ao menos uma fonte de proteína, peptídeo, aminoácido ou carboidrato e uma substância moduladora da mucosa, preferivelmente o hidroximetilbutirato. Quanto ao volume ideal, depende dos nutrientes que compõem

a solução a ser inoculada, mas, de acordo com as pesquisas são usados volumes de solução entre 0,5 e 1 mL, com osmolaridade em torno de 400 – 500 mOsm.

Além do nutriente utilizado, a resposta dos animais à inoculação *in ovo* irá depender da genética, idade da matriz, tamanho dos ovos, e das condições de incubação (Uni e Ferket, 2004).

2.4. GLICEROL

O glicerol ou propano-1,2,3-triol é um composto orgânico de função álcool, higroscópico, inodoro, viscoso, de sabor adocicado (IUPAC, 1993), que pode ser obtido de gorduras animais, óleos vegetais ou da indústria petroquímica (Schuchardt et al., 1998). O glicerol é encontrado nas lipoproteínas do sangue dos animais, oriundo da lipólise do tecido adiposo ou da gordura da dieta (Lin, 1977) como também, em todos triglicerídeos presentes no corpo.

Com a hidrólise dos triglicerídeos no organismo animal há liberação do glicerol no qual os três ácidos graxos estão esterificados. Esse composto de três carbonos, então, é convertido em D-gliceraldeído-3-fosfato o qual pode ser incorporado na via glicolítica (Figura 2) (Nelson et al. 2008). Dessa forma, o glicerol pode contribuir por meio da glicólise para síntese de piruvato, gerando energia ou aminoácidos, ou através da gliconeogênese para síntese de glicose (Sunny, 2011).

Segundo Lammers et al. (2008) o glicerol puro tem 4.305 kcal/kg de energia bruta e alta eficiência para ser utilizado pelos animais. A glicerina, produto com em média 80% de glicerol, é considerada atóxica no organismo animal, desde que sua utilização respeite os limites de pureza estipulados e recomendados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Arruda et al., 2007). Em frangos de corte, Dozier et al. (2008) observaram que a energia metabolizável aparente do glicerol é de 3.621kcal/kg dos 7 aos 10 dias de idade, e de 3.331kcal/kg no período de 21 a 24 dias. Assim, esses valores se assemelham a energia metabolizável aparente do milho (3.364 kcal/kg, Rostagno et al., 2017) sugerindo que o glicerol pode ser utilizado como uma fonte de energia na ração das aves.

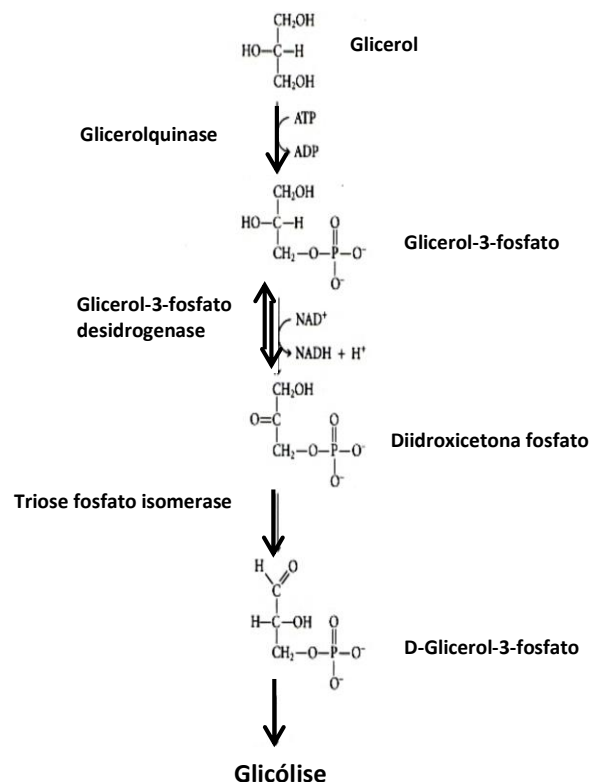
Após ingestão pelos frangos de corte o glicerol presente na dieta é prontamente absorvido no intestino (Dozier et al., 2011). A absorção ocorre por meio de duas rotas,

sendo que mais de 70% ocorre por transporte ativo dependente de Na, e o restante absorvido por difusão (Hara-Chikuma e Verkman, 2006; Alvarenga et al., 2012).

Após absorvido, para ser utilizado como fonte energética o glicerol precisa ser convertido até a formação do gliceraldeído-3-fosfato, via dependente de três enzimas que estão presentes principalmente no fígado, e em menores proporções nos rins (Sunny, 2008). Além de servir como combustível para fígado e rins, já foi observado utilização do glicerol em menores quantidades por cérebro, pulmões, mucosa intestinal, tecido adiposo e esquelético, músculo cardíaco, leucócitos, fibroblastos e esperma (Stryer et al., 2008). No epitélio intestinal e fígado o gliceraldeído-3-fosfato é substrato para gliconeogênese, oxidação e síntese lipídica (Wang, 2014).

Os hormônios insulina e glucagon são os responsáveis pelo controle do metabolismo do glicerol. Nas aves, a insulina aumenta os níveis séricos da substância, já o glucagon estimula a liberação de ácidos graxos e glicerol dos adipócitos e aumenta a gliconeogênese (Alvarenga et al., 2012). No entanto, quando o glicerol alcança altas concentrações no sangue, como após a ingestão, ele é utilizado para a síntese lipídica (Alvarenga et al., 2012).

FIGURA 2. ENTRADA DO GLICEROL NA VIA GLICOLÍTICA.



ADAPTADO: Nelson e Cox (2002)

Devido a seu efeito gliconeogênico o glicerol também pode agir como poupador de aminoácidos (Chan et al., 1981). Em estudos com adição de glicerina na dieta de frangos Cerrate et al. (2006) observaram, além da função energética, que o glicerol auxiliou no metabolismo proteico a partir da economia de aminoácidos glicogênicos e consequentemente favoreceu a deposição de proteína corporal, pois inibiu a atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase e glutamato desidrogenase. Ainda, estudos adicionando glicerol na alimentação de frangos de corte observaram benefícios no desempenho e rendimento de carcaça (Simon et al., 1996; Cerrate et al., 2006; Guerra et al., 2011; Silva et al., 2012).

2.5. GLICEROL NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

O aumento da produção de glicerina em grande escala pela indústria de biocombustíveis proporcionou queda de preços (Dharmadi et al., 2006) e despertou o interesse em utilizar a glicerina como fonte de glicerol na avicultura. Devido sua característica energética o glicerol vem sendo alvo de pesquisas para incorporação à dieta de frangos de corte desde a década de 60.

O melhor nível de inclusão de glicerina ainda não foi definido, no entanto, é observado que o ideal está entre 5 a 10% para frangos (Swiatkiewicz e Koreleski, 2009; Schmidt e Zsédely, 2010; McLea et al., 2011). Alguns efeitos negativos já foram observados em doses maiores que essas, como a depressão do consumo com inclusão de 15% de glicerol (Schmidt e Zsédely, 2010). Aparentemente, alcança-se a capacidade máxima de metabolização de glicerol por frangos de corte com inclusão de 7,5% de glicerol na dieta (Romano et al. 2014), sendo as enzimas glicerol quinase (Vernon e Walker, 1970) juntamente com a hidroxiketona fosfato desidrogenase (Lin et al., 1976) os fatores limitantes. No entanto, se a quantidade de glicerol no organismo ultrapassa a capacidade enzimática, há aumento nos seus níveis séricos e excreção (Robinson e Newsholme, 1969). Portanto, os efeitos negativos observados como redução do consumo, podem decorrer devido ao excesso de glicerol no sangue levando ao aumento de insulina, a qual age no hipotálamo favorecendo a saciedade. Ainda, parece que com o passar da idade os frangos têm a capacidade de metabolização do glicerol diminuída (Cerrate et al., 2006, McLea et al., 2011).

Assim, Romano et al. (2014), avaliando a eficiência de utilização do glicerol em frangos de corte, observaram que o melhor aproveitamento ocorreu com 7,5% de inclusão na dieta. Já, em relação ao desempenho inclusões de 5 a 6,7% apresentaram melhores conversões alimentares, não sendo observados outros efeitos negativos (Swiatkiewicz e Koreleski, 2009; Schmidt e Zsédely, 2010). Topal e Ozdogan (2013) observaram com a adição de 4% a 8% de glicerol na ração maior ganho de peso aos 42 dias com a maior dose ($P=0.005$), e melhor conversão alimentar nos tratamentos com glicerol. No mesmo estudo, houve diminuição dos teores de extrato etéreo no músculo da coxa das carcaças, relacionado a substituição de óleo na ração pela glicerina.

O glicerol se comporta como uma fonte energética facilmente utilizada pelo corpo, sendo absorvida sem necessidade de lise ou formação de micelas, e com poucas etapas antes de entrar na glicólise e gerar energia. De tal forma, quando comparado a adição de fontes energéticas prontamente utilizáveis, como glicose e sacarose, frangos alimentados com glicerol apresentaram maior peso corporal aos 24 dias (Wang, 2014). Ainda, o glicerol pode ser uma fonte energética alternativa quando há redução de consumo em situações de estresse por calor e procura-se adensar a dieta. Moraes et al. (2016) avaliaram a administração de glicerol via água de bebida em frangos em estresse térmico e observaram que os animais que receberam 2% de glicerol na água apresentaram maior ganho de peso e consumo de ração, água e energia. Contudo, no mesmo estudo os animais em conforto térmico tiveram parâmetros de desempenho diminuídos com a ingestão de glicerol na água. O aumento observado em ingestão de água, provavelmente é fruto da alteração da osmolaridade sanguínea pelo glicerol (Moraes et al., 2016; Mushtaq et al., 2013), e com o consumo de energia presente na água, consequentemente houve maior ganho de peso.

Há varias fontes de glicerina que podem ser utilizadas na alimentação animal, como por exemplo os subprodutos da produção de biodiesel de óleo de soja. Bernardino et al. (2012) trabalharam com três fontes de glicerol na ração: glicerina bruta de soja, glicerina bruta mista e glicerina semipurificada, e observaram que independente da fonte houve aumento do nível de glicerol sérico, com relação linear positiva, tal como a aumento da atividade de glicerol quinase.

Pela pequena cadeia de carbonos apolar, que proporciona difusão pela membrana plasmática e capacidade energética o glicerol é um potencial substrato para células, sendo utilizado em cultivos celulares e como substrato para fermentação microbiana (Silva et al., 2009). Já foi detectado que muitos microrganismos tem a capacidade de crescer em meio anaeróbio utilizando glicerol como única fonte de carbono, (Seifert et al., 2001; Biebl, 2001; Ito et al., 2005). Dentre elas estão: *Clostridium butyricum* (Malaoui e Marczak, 2001; Colin et al., 2001) e *Lactobacillus reuteri* (Talarico et al., 1988, 1990) que podem ser utilizadas como probióticos em dietas de frango de corte (Yu et al., 2007; Yang et al., 2012). Sendo assim, quando presente na dieta de frangos de corte, algumas pesquisas sugerem que o glicerol também age como pré-biótico.

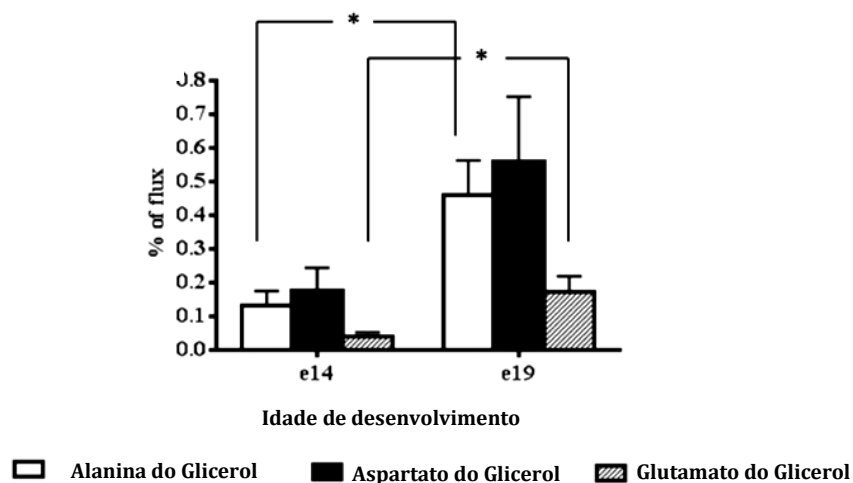
Bactérias ácido lácticas, por exemplo, tem seu crescimento e produção de bactericinas aumentados quando fermentam glicerol junto com um açúcar (Talarico et al., 1990; Sauvageot et al., 2000; Strandberg et al., 2010; O'Shea et al., 2012; Ozdogan et al., 2014). A ação dessas bactericinas e competição com os outros microrganismos faz com que o número de bactérias patogênicas como Enterobactérias, Coliformes, *Salmonella spp.* sejam reduzidas no lúmen intestinal com o fornecimento de glicerol para os animais. Algumas bactérias patogênicas, no duodeno de frangos são afetadas pela inclusão de 4% e 8% de glicerol, sendo que a inclusão de 4% gerou a maior redução de Enterobactérias e Coliformes, e 8% menos Staphilococos e *Salmonella spp.* (Ozdogan, 2014). Quando 5% de glicerol é adicionado em conjunto com probiótico de bactérias ácido lácticas houve efeito de sinergia contra *Salmonella enteritidis*, chegando a negativar sua detecção (Delgado et al., 2014).

Ainda, alguns trabalhos mostram efeito do glicerol no desenvolvimento das vilosidades, Ozdogan (2014) observou vilos mais altos no íleo, cripta mais profundas no duodeno de frangos alimentados com 4% e 8% de glicerol na ração. Acredita-se que ação trófica do glicerol sobre as vilosidades intestinais ocorre de maneira indireta, por ser substrato para microrganismos produtores de ácidos graxos de cadeia curta e esses agirem sobre a mucosa intestinal (Da Silva et al., 2009; Ozdogan, 2014). Assim, o aumento da área absorptiva e a redução de agentes patogênicos podem influenciar nos resultados de melhor desempenho dos animais alimentados com glicerol.

2.6. GLICEROL NA NUTRIÇÃO *IN OVO*

O glicerol está naturalmente presente nos triglicerídeos da gema, sendo liberado quando há quebra destes para gerar energia. No metabolismo do embrião o glicerol é o principal substrato para a formação do glicogênio hepático, ultrapassando a glicose e aminoácidos glicogênicos (Sunny e Bequette, 2011). Enquanto os ácidos graxos dos lipídeos da gema são utilizados para fornecimento de energia pela betaoxidação, os mesmos autores afirmam, que o glicerol é utilizado como maior precursor de síntese de glicose, glicogênio e aminoácidos não essenciais como alanina, aspartato e glutamina. A utilização do glicerol como substrato para esses compostos é mais significativa em embriões no terço final da incubação (Figura 3.), sugerindo que a maior utilização da gema após os E14 se deve a necessidade do feto em formar reservas para o nascimento (Hu et al., 2016). Assim, a utilização do glicerol para esses fins parece ser um mecanismo poupador de glicose, sendo estratégias como essa, de vias indiretas para formação do glicogênio hepático, já observadas em humanos e ratos (Katz e McGarry, 1984; Huang e Veech, 1988).

FIGURA 3. CONTRIBUIÇÃO (% DE FLUXO) DO GLICEROL SÉRICA PARA SÍNTESE DE ALANINA, ASPARTATO E GLUTAMATO NO FÍGADO DE EMBRIÕES COM 14 E 19 DIAS DE DESENVOLVIMENTO (E14 E E19 RESPECTIVAMENTE), SUBMETIDOS A 8H DE INFUSÃO CONTÍNUA DE [$^{13}\text{C}_3$] GLICEROL (* $P < 0.05$).



Adaptado: Hu et al. (2016)

O glicogênio e a glicose sérica são utilizados como substrato energético durante o exaustivo processo de eclosão, porém se exauridas essas reservas o embrião começa a degradar proteína muscular para geração de energia. O glicerol

parece um interessante composto para utilização na nutrição *in ovo*, pois, sua função gliconeogênica e poupadora de aminoácidos pode proporcionar aumento de glicemia e reservas de glicogênio, evitando o catabolismo muscular após a eclosão. Sunny (2008) observou aumento significativo de glicose sanguínea, glicogênio muscular e hepático com isótopos marcados após a inoculação de glicerol marcado em ovos embrionados. No mesmo trabalho, ovos mais leves tiveram maiores níveis de glicose e glicogênio oriundos do glicerol inoculado que os mais pesados. Tais resultados podem ser reflexo da menor quantidade de gema nos ovos menores, o que diminui a quantidade de glicerol disponível e limitaria a formação de reserva energética do embrião. Em frangos de corte com 19 dias de desenvolvimento embrionário, observou-se o aproveitamento de glicerol administrado para gliconeogênese, sendo responsável por 2,1% da glicose circulante, e contribuindo, também, para síntese de alanina, glutamato e maior quantidade de acetil CoA no fígado (Hu e Bequette, 2016).

O glicerol, também, parece ter influência no aumento da reabsorção de água pelos rins (Montner et al., 1999). Coutts et al. (2002) observaram que triatletas que consumiram bebidas com 1,2g glicerol/kg de peso corporal tiveram performance melhores, menor produção de urina, e aumento de retenção de fluídos corporais. Dessa forma, a sua administração *in ovo* talvez minimize a desidratação que ocorre da eclosão até a chegada à granja.

No entanto, em estudo inoculando glicerol Neves (2015) não observou efeitos poupadores de aminoácidos, apesar de apresentar aumento no conteúdo do saco vitelínico ao nascimento e aos sete dias, sugerindo que o glicerol contribuiu para aumentar as reservas energéticas do embrião e diminuir a utilização do vitelo. O desenvolvimento do epitélio intestinal pós-eclosão apresentou melhores parâmetros com a inoculação do glicerol, com aumento linear na altura dos vilos no duodeno e no íleo e da profundidade das criptas no jejuno e íleo das aves. Contudo, não houve diferença de desempenho aos 7 dias e a dose de 50mmol/ml de glicerol promoveu atraso na eclosão. Rocha et al. (2013) não observaram diferença em peso de órgãos do TGI com a inoculação de glicerol *in ovo*, no entanto houve efeito quadrático no peso de saco de gema após 24h do nascimento. No mesmo estudo, aos 7 dias de idade, os pintinhos inoculados com glicerol apresentaram aumento no consumo de ração com o aumento da dose de glicerol, e também, foi observado efeito quadrático para ganho de peso. Contudo, são necessárias mais pesquisas para esclarecer os

efeitos do glicerol na eclodibilidade e efeito no desempenho dos frangos de corte, tal como, avaliar a melhor dose para nutrição *in ovo*.

2.7. DIFERENÇA ENTRE OVOS DE MATRIZES DE IDADES DIFERENTES

As matrizes produtoras dos frangos de corte permanecem longo período produzindo ovos, que geralmente decorre da 24^a a 68^a semana de idade. Durante esse período, ocorrem mudanças fisiológicas na fêmea que refletem na qualidade dos ovos e consequentemente dos pintinhos produzidos. Com o envelhecer das reprodutoras o intervalo entre ovulações aumenta, bem como a produção de folículos e ovos maiores (Maiorka et al., 2013), resultando em gemas 3 gramas mais pesadas em ovos de matrizes de 59 semanas quando comparadas com reprodutoras de 29 semanas (Nangsuay et al., 2016). Esse aumento ocorre, pois, as aves depositam a mesma quantidade de vitelo produzida no fígado em um número menor de folículos (Zakaria et al., 1983).

Em estudos com ovos oriundos de matrizes com 27 e 62 semanas, Vieira e Moran (1998) observaram maiores proporções de gema e matéria seca e menores proporções de albúmen e casca nos ovos de matrizes mais velhas. Entretanto, as proporções de aminoácidos e minerais no saco da gema e nas carcaças de pintainhos oriundos de lotes desses dois extremos de idade foram semelhantes, porém os animais gerados por lotes mais velhos foram mais pesados. Resultados semelhantes foram encontrados por Ulmer-Franco et al. (2010) quando matrizes com 29 semanas produziram ovos com menores porcentagem de gema e maior de albúmen que aquelas com 59 semanas de idade. Contudo, quando comparado aos ovos de diferentes idades, mas mesmo tamanho, não foram encontradas diferenças em peso de gema seca e peso de casca. No mesmo estudo o peso aos 21 e 41 dias de idade, bem como o ganho de peso, foram significativamente menor em animais oriundos das matrizes mais jovens, no entanto a conversão alimentar foi pior nos pintinhos de matrizes com 59 semanas.

Acreditava-se também, que pintinhos originados de reprodutoras mais velhas possuíam o trato gastrointestinal mais desenvolvido, sendo mais aptos a aproveitar a alimentação exógena, o que responderia o maior ganho de peso desses pintinhos, observado em alguns estudos. Maiorka et al. (2004) observaram menores TGI e

atividade de tripsina e lipase pancreática em embriões com 20 dias de incubação oriundos de matrizes de 30 semanas quando comparado aos de lotes com 60 semanas. Porém, pesquisas mais recentes não têm obtido mesmos resultados, não sendo observadas diferenças na morfometria do intestino de pintinhos oriundos de reprodutoras com diferentes idades (Tanure et al., 2015; Maiorka et al., 2016). Nangsuay et al., (2016) também não observaram diferenças de peso de fígado, coração, estômago e intestino de embriões e neonatos produzidos por lotes de 29 e 54 semanas. A diferença dos resultados pode ocorrer devido a seleção genética para pintinhos mais aptos ao aproveitamento da dieta nos seus 10 anos, como também, melhoras no manejo e nutrição das matrizes pesadas. Ainda o momento da coleta dos tecidos para valiação dos parâmetros é muito importante, uma vez que os pintinhos de matrizes jovens nascem primeiro eles estarão submetidos a um maior tempo de estresse térmico, sem alimentação e água dentro das incubadoras, o que interfere nas características avaliadas como histomorfometria intestinal, atividade enzimática e peso dos órgãos.

Os ovos de matrizes com idades distintas também possuem diferenças em relação à casca e espessura de albúmen, características que influenciam na evaporação da água, troca gasosa do embrião com o meio externo e consequentemente afetam o metabolismo embrionário e eclodibilidade. Semelhante ao que decorre com a gema, a quantidade de cálcio depositada na casca é a mesma durante todo ciclo produtivo. Assim, com a produção de ovos maiores a casca torna-se mais fina em ovos de matrizes mais velhas (Hamilton, 1982; Brake, 1996). Os ovos de matrizes mais velhas apresentam casca mais fina e com maior quantidade de poros, aumentando sua capacidade de condutância (Funderbunk et al., 2005; Barbosa et al. 2012). Ainda, a maior concentração de proteínas no albúmen de ovos de reprodutoras mais jovens, que o torna mais espesso, dificulta a oxigenação do embrião e a utilização de vitaminas (Brake, 1996). Uma vez que a maior fonte energética para o embrião advém da oxidação de ácidos graxos, a menor disponibilidade de oxigênio retarda a utilização dos lipídios do saco vitelínico, atrasando o desenvolvimento do embrião (Nangsuay et al., 2015) e diminuindo o peso do pintinho em relação ao peso do ovo (Pulikanti et al., 2012).

As diferenças de composição e características dos ovos parecem não decorrer somente da idade da reprodutora, sendo afetadas, também, pelo tamanho dos ovos.

McLoughlin e Gous (2000) observaram que os embriões de ovos pequenos começam a atrasar seu crescimento a partir do oitavo dia de incubação. Embriões provenientes de ovos grandes ou pequenos, apesar das diferenças em quantidade de substrato disponível para desenvolvimento e crescimento, apresentam taxas similares de gliconeogênese e de eficiência energética. Por essa razão a diferença de nutrientes disponíveis nos ovos seria a causa da variação de peso entre pintainhos de ovos com diferentes tamanhos (Sunny, 2008). Como os lipídios da gema compõem 90% da fonte energética do embrião (Romanoff, 1960) a baixa proporção de gema pode ser uma desvantagem nos ovos menores. Nangsuay et al. (2011) observaram, no entanto, que embriões de ovos leves absorvem maiores proporções de gema que os ovos pesados, comportamento que pode ser uma maneira de compensar a baixa quantidade de nutrientes. Quando os mesmos autores avaliaram a absorção do saco vitelínico dentro de diferentes idades de matrizes, os pintinhos de galinhas mais velhas tiveram maior absorção e assimilação da gema. A maior absorção do vitelo, junto com a maior quantidade de nutrientes nos ovos justifica os pintinhos mais pesados produzidos por lotes de matrizes mais velhas (Suarez et al., 1997; O'Dea et al., 2004).

A mucosa intestinal parece ser influenciada pelo tamanho dos ovos, pois embriões de ovos pesados tiveram maior altura de vilos duodenais, jejunais e ileais, e maior profundidade de criptas no jejuno quando comparados com ovos leves (Gimenez et al., 2008). Uma vez que, o desenvolvimento do epitélio é influenciado pela passagem de nutrientes, a maior altura de vilos pode estar associada a maior quantidade de líquido amniótico e albúmen deglutidos pelos embriões de ovos maiores.

Diferenças hormonais dos embriões também são notadas com o envelhecimento das matrizes, sendo o hormônio T4, que estimula o crescimento, mais elevado em embriões de matrizes velhas, enquanto o T3, responsável pelo metabolismo do glicogênio é mais alto nos ovos de reprodutoras jovens (Oliveira, 2007). Porém, segundo o mesmo autor, essa variação hormonal pode ocorrer pelas diferenças nutricionais nos ovos. Quando comparados embriões de matrizes de 26 semanas e de 42 semanas observou-se que a AMPK, proteína responsável pela ativação de vias que aumentam a síntese de ATP, como a glicólise e oxidação de ácidos graxos e que coordena o uso de nutrientes em embriões de frango, foi maior em ovos maiores (Hu et al., 2016).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCROFT, W. M. **Incubation and hatchery practice**. London: Her Majesty's Stationary Office, 1964. 71 p.
2. AL-MURRANI W.K. Effects of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v. 23, p. 171-174, 1982.
3. ALVARENGA, R. R. et al. Use of glycerine in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, n. 04, p. 637-644, dez 2012.
4. ARRUDA, P V; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, MG de A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v. 26, p. 56-62, 2007.
5. BALLARD, F. J.; OLIVER, I. T. Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. **Biochimica et biophysica acta**, v. 71, p. 578-588, 1963.
6. BARBOSA V. M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. FEP MVZ UFMG. Belo Horizonte, 2011.
7. BERNARDINO, V. M. P., et al. Content of plasmatic glycerol and activity of hepatic glycerol kinase in broiler chickens fed diets containing different sources and concentrations of glycerine. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 98, n. 2, p. 328-337, maio 2014.
8. BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*—batch and continuous culture studies. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18-26, jul. 2001.
9. BJoNNES, P. O.; AULIE, ARNFINN; HØIBY, M. Effects of hypoxia on the metabolism of embryos and chicks of domestic fowl. **The Journal of experimental zoology**. Supplement: published under auspices of the American Society of Zoologists and the Division of Comparative Physiology and Biochemistry/the Wistar Institute of Anatomy and Biology, v. 1, p. 209-212, jan. 1986.
10. BRAKE, J. T. Optimización del almacenaje de huevos fértiles. **Avicultura Profesional**, v. 14, n. 6, p. 26-31, 1996.
11. CERRATE, S. et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 11, p. 1001-1007, 2006.
12. CHAN, P. H.; POLLACK, E.; FISHMAN, R. A. Differential effects of hypertonic mannitol and glycerol on rat brain metabolism and amino acids. **Brain Research**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 143-153, nov. 1981

13. CHRISTENSEN, V. L. et al. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80, n. 12, p. 1729-1735, dez. 2001.
14. CHRISTENSEN, VERN L.; ORT, DEBBIE T.; GRIMES, JESSE L. Physiological factors associated with weak neonatal poult (Meleagris gallopavo). **International Journal of Poultry Science**, v. 2, p. 7-14, 2003.
15. COLIN, THIERRY, et al. Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Current Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 238-243, out. 2001.
16. COUTTS, AARON, et al. The effect of glycerol hyperhydration on Olympic distance triathlon performance in high ambient temperatures. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 105-119, 2002.
17. DA SILVA, G P; MACK, M; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, jan/fev. 2009.
18. DAVIS, C.; REEVES, R. High Value Opportunities from The Chicken Egg. A report for the **Rural Industries Research and Development Corporation**. RIRDC Publication. <www.rirdc.gov.au>, 2002.
19. DEEMING, D. C. **Avian incubation: behaviour, environment, and evolution**. Lincoln: Oxford University Press, 2002.
20. DELGADO, R. , et al. Glycerol supplementation enhances the protective effect of dietary FloraMax-B11 against *Salmonella Enteritidis* colonization in neonate broiler chickens. **Poultry science**, p. ps3927, agost. 2014.
21. DHARMADI, Y; MURARKA, A; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 821-829, mai. 2006.
22. DONALDSON, W. E. Carbohydrate, hatchery stressors affect poult survival. **Feedstuffs (USA)**, 1995.
23. DOZIER, W. A et al. Apparent Metabolizable Energy of Glycerin for Broiler Chickens. **Poultry Science** College Station. n. 87, p 317-322, 2008.
24. DOZIER, W. A.; KERR, B. J.; BRANTON, S. L. Apparent metabolizable energy of crude glycerin originating from different sources in broiler chickens. **Poultry science**, v. 90, n. 11, p. 2528-2534, Nov 2011.
25. EL SABRY, M. I. et al. Effect of breeder age and lighting regimen on growth performance, organ weights, villus development, and bursa of fabricius histological structure in broiler chickens. **Czech J. Anim. Sci**, v. 60, p. 116-122, 2015.

26. EVERAET, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. In: Macari M. et al. **Manejo da incubação**. FACTA, 2013, pg. 31-45.
27. GONÇALVES, F. et al. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 62, p. 45-55, sep. 2013.
28. FOYE, O. T.; UNI, Z.; FERKET, P. R. Effect of in ovo feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1185-1192, jul. 2006.
29. FREEMAN, B. M.; VINCE, M. A. **Development of the avian embryo**. London: Chapman and Hall, 1974. 362 p.
30. FUNDERBUNK, S. et al. Effects of egg size and eggshell conductance on poult livability and body weight gain. **Poultry science**. Vol. 84, pp. 33-33, 2005.
31. GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, Cairo, v. 2010, p. 1-12, Jan. 2010.
32. GIMENEZ, A. C., RICCARDI, R. R., MALHEIROS, E. B., & BOLELI, I. C.. Influência do sexo e peso dos ovos sobre a altura dos vilos e profundidade das criptas do intestino delgado de embriões e pintos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 608-616, 2008.
33. GUERRA, R. L. D. H., et al. Glicerina bruta mista na alimentação de frangos de corte (1 a 42 dias). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 4, out/dez. 2011.
34. GUYTON, Arthur C. Textbook of Medical Physiology. 8ª ed. WB Saunders Company. **Philadelphia, PA**, 1991.
35. HAMILTON, R. M. G. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. **Poultry science**, v. 61, n. 10, p. 2022-2039, out. 1982.
36. HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A. S. Physiology roles of glyceroltransporting aquaporins: the aquaglyceroporins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 63, n. 12, p. 1386-1392, Jun. 2006.
37. HAZELWOOD, Robert L. Endocrine control of avian carbohydrate metabolism. **Poultry science**, v. 50, n. 1, p. 9-18, 1971.
38. HÖBER, R; HÖBER, J. Experiments on the absorption of organic solutes in the small intestine of rats. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 10, n. 4, p. 401-422, 1937

39. HOIBY, M; AULIE, A; BJONNES, Per Ole. Anaerobic metabolism in fowl embryos during normal incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 86, n. 1, p. 91-94, 1987.
40. HU, Q.; AGARWAL, U.; BEQUETTE, B. J. Energy sensing in developing chicken embryos and posthatch chicks from different size eggs. **Poultry science**, v. 92, n. 6, p. 1650-1654, jun. 2013.
41. HU, Q.; AGARWAL, U.; BEQUETTE, B. J. Gluconeogenesis, non-essential amino acid synthesis and substrate partitioning in chicken embryos during later development. **Poultry science**, v. 96, n. 2, p. 414-424, agos. 2016.
42. HUANG, Ming-Ta; VEECH, R L. Role of the direct and indirect pathways for glycogen synthesis in rat liver in the postprandial state. **Journal of Clinical Investigation**, v. 81, n. 3, p. 872, 1988.
43. HUMPHREY, B D.; RUDRAPPA, S G. Increased glucose availability activates chicken thymocyte metabolism and survival. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 6, p. 1153-1157, 2008.
44. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds**. Oxford, 1993. 1330 p.
45. ITO, T., et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260-265, set. 2005.
46. JOHN, T. M.; GEORGE, J. C.; MORAN JR, E. T. Metabolic changes in pectoral muscle and liver of turkey embryos in relation to hatching: influence of glucose and antibiotic-treatment of eggs. **Poultry Science**, v. 67, n. 3, p. 463-469, mar. 1988.
47. JOHN, T. M.; GEORGE, J. C.; MORAN JR, E. T. Pre-and post-hatch ultrastructural and metabolic changes in the hatching muscle of turkey embryos from antibiotic and glucose treated eggs. **Cytobios**, v. 49, n. 198-199, p. 197-210, jan. 1986.
48. KATZ, J.; MCGARRY, J. D. The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism?. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 6, p. 1901, 1984.
49. KEIRS, R. W. et al. Effects of supportive gluconeogenic substances on the early performance of broilers under adequate brooding conditions. **Journal of applied poultry research**, v. 11, n. 4, p. 367-372, dez. 2002.
50. KREBS, H. A. Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals. **Advances in enzyme regulation**, v. 10, p. 397-420, nov. 1972.
51. LAMMERS, P. et al. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 104-107, 2008.

52. LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1977
53. LIN, M. H., ROMSOS, D. R., & LEVEILLE, G. A. (1976). Effect of glycerol on lipogenic enzyme activities and on fatty acid synthesis in the rat and chicken. **The Journal of nutrition**, v. 106, n. 11, p. 1668-1677, 1976.
54. LU, J. W.; MCMURTRY, J. P.; COON, C. N. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. **Poultry science**, v. 86, n. 4, p. 673-683, abr. 2007.
55. MACARI, M. et al. **Manejo de incubação**. 3. ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. 468 p, fotografia color., 11,71x9 cm.
56. MAIORKA, A. et al. Effect of broiler breeder age on pancreas enzymes activity and digestive tract weight of embryos and chicks. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 1, p. 19-22, 2004.
57. MAIORKA, A. Idade da matriz e qualidade do pintinho. In: Macari M. et al. *Manejo da incubação*. FACTA, 2013, pg. 163-175.
58. MAIORKA, A. et al, H. Effect of Broiler Breeder Age and Glutamine Supplementation on the Development of the Intestinal Mucosa of 7-Day-Old Chicks. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 18, n. 1, p. 17-22, jan/mar. 2016.
59. MALAOUI, H.; MARCZAK, R. Separation and characterization of the 1, 3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1006-1014, jun. 2001.
60. MARCHAIM, U.; KULKA, R. G. The non-parallel increase of amylase, chymotrypsinogen and procarboxypeptidase in the developing chick pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 146, n. 2, p. 553-559, Nov. 1967.
61. MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E.; AHERN, K. G. Carbohydrate metabolism I: anaerobic processes in generating metabolic energy. **Biochemistry**, p. 670-703, 1990.
62. MCLEA, L. et al. The effect of glycerol inclusion on broiler performance and nutrient digestibility. **British poultry science**, v. 52, n. 3, p. 368-375, jun 2011.
63. MCLOUGHLIN, L.; GOUS, R. M. Efecto del tamaño del huevo en el crecimiento pre y post natal de pollitos de engorde. **Avicultura Profesional**, v. 18, p. 24-29, 2000.

64. MONTNER, P. et al. Glycerol hiperhydration alters cardiovascular and renal function. **Journal of Exercise Physiology**, London, v. 2, n. 1, Jan. 1999. Disponível em: <<https://www.asep.org/asep/asep/jan12c.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2016.
65. MORAES, P. O. et al. Effects of the Addition of Pure Glycerin Supplementation in the Drinking Water on the Performance of Broilers Submitted to Heat Stress and Feed Restriction. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas v. 18, n. 3, p. 413-418, jul./set. 2016.
66. MORAN JR, E. T. Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. **Poultry Science**, v. 86, p.1043-1049, 2007
67. MORAN, Edwin T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 665-674, 1985.
68. MURAMATSU, T. et al. Importance of albumen content in whole-body protein synthesis of the chicken embryo during incubation. **British poultry science**, v. 31, n. 1, p. 101-106, 1990.
69. MUSHTAQ, M. M. H. et al. Electrolytes, dietary electrolyte balance and salts in broilers: an updated review on growth performance, water intake and litter quality. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge. v. 69, n. 4, p. 789, dez. 2013.
70. NANGSUAY, A. et al. Development and nutrient metabolism of embryos from two modern broiler strains. **Poultry science**, v. 94, n. 10, p. 2546-2554, 2015.
71. NANGSUAY, A. et al. Effects of breeder age, broiler strain, and eggshell temperature on development and physiological status of embryos and hatchlings. **Poultry science**, v. 95, n. 7, p. 1666-1679, mar. 2016.
72. NANGSUAY, A. et al. Yolk absorption and embryo development of small and large eggs originating from young and old breeder hens. **Poultry science**, v. 90, n. 11, p. 2648-2655, nov. 2011.
73. NELSON, D L.; LEHNINGER, A L.; COX, Michael M. **Lehninger Principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.
74. NELSON, D L.; LEHNINGER, A L.; COX, Michael M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2002. fotografia color., 8,3X5,8 cm.
75. O'DEA, E. E., et al. Investigating the eggshell conductance and embryonic metabolism of modern and unselected domestic avian genetic strains at two flock ages. **Poultry science**, v. 83, n. 12, p. 2059-2070, 2004.
76. O'SHEA, Eileen F. et al. Subspecies diversity in bacteriocin production by intestinal *Lactobacillus salivarius* strains. **Gut microbes**, v. 3, n. 5, p. 468-473, ag. 2012.

77. OHTA Y. et al. Effect of Amino Acid Injection in Broiler Breeder Eggs on Embryonic Growth and Hatchability of Chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1493-1498, 1999.
78. OLIVEIRA, J. E. Effects of in ovo feeding on turkey embryos development, energy status, intestinal maturation, gene expression and post-hatch development. 200. 316 f. Tese- Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh, 2007
79. OLIVEIRA, J. E.; UNI, Z.; FERKET, P. R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's poultry science journal**, v. 64, n. 4, p. 488-499, 2008.
80. OZDOGAN, M. et al. Effect of different levels of crude glycerol on the morphology and some pathogenic bacteria of the small intestine in male broilers. **animal**, v. 8, n. 01, p. 36-42, jan. 2014.
81. PEARCE, J. Carbohydrate metabolism in the domestic fowl. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 30, n. 3, p. 254-259, 1971.
82. PEARCE, J. e BROWN, W.O. **Carbohydrate metabolism**. Academic Press, London, 1971.
83. PEARCE, J. Some differences between avian and mammaeian biochemistry. **International Journal of Biochemistry**, v. 8, n. 4, p. 269-275, 1977.
84. PICARDO, M.; DICKSON, A. J. Hormonal regulation of glycogen metabolism in hepatocyte suspensions isolated from chicken embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 689-693, 1982.
85. PULIKANTI, R. et al. Physiological relationships of the early posthatch performance of broilers to their embryo and eggshell characteristics. **Poultry science**, v. 91, n. 7, p. 1552-1557, jul. 2012.
86. ROBINSON, J; NEWSHOLME, E. A. The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. **Biochemical Journal**, v. 112, n. 4, p. 449-453, mai 1969.
87. ROCHA, C., et al. 2013:. In ovo feeding of glycerol to broiler chickens. In *24th Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, Australia, 17-20 February 2013* (pp. 159-161). Poultry Research Foundation.
88. ROMANO, G. G. et al. Effects of glycerol on the metabolism of broilers fed increasing glycerine levels. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas. v. 16, n. 1, p. 97-105, jan/mar 2014.
89. ROMANOFF, A.L. The avian embryo; structural and functional development Macmillian, New York, NY, 1960.
90. ROSTAGNO, H S, et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos**. Viçosa: UFV, 2007.

91. SANTOS, T.T. Influência da inoculação de ingredientes intra ovo em aspectos produtivos e morfológicos de frangos de corte oriundos de distintos pesos de ovos. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. 63 pp, 2007.
92. SAUVAGEOT, N., et al. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. **International journal of food microbiology**, v. 55, n. 1, p. 167-170, mar. 2000.
93. SCHMIDT, J., & ZSÉDELY, E. Importance of glycerol in the nutrition of monogastric Animals: 1. Dietary glycerol for broiler chicken. **Állattenyésztés és Takarmányozás**, v. 59, n. 5/6, p. 457-469, 2010.
94. SEIFERT, C., et al. R.. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. **European journal of biochemistry**, v. 268, n. 8, p. 2369-2378, abr. 2001.
95. SHUCHARDT, U. F.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 199-210, maio 1998.
96. SILVA, C. L. S., et al. Glycerine derived from biodiesel production as a feedstuff for broiler diets. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 193-202, jul./set. 2012
97. SIMON, A. Administration og glycerol to broilers in the drinking water. **Landbauforschung Voelkenrode**, Braunschweig, v. 169, p. 168-170, 1996.
98. STRANDBERG, K L. et al. Glycerol monolaurate inhibits *Candida* and *Gardnerella vaginalis* in vitro and in vivo but not *Lactobacillus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 597-601, fev. 2010.
99. STRIGUINI, J. H., et al. "Desenvolvimento do sistema digestório em aves.". Disponível em < http://www.cbna.com.br/anais/bd6140b0-a83f-4724-aacc-75dbfe0eedd8/palestras/Palestra_1_Jose_Henrique_Stringhini.pdf.> . Acesso em: 5/11/15.
100. STRYER L, TYMOCZKO JL, BERG JM. Bioquímica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
101. STURKIE, P. D. **Sturkie's avian physiology**. 5th ed. London: Academic, 1998.
102. SUAREZ, M. E. et al. Effect of strain and age of the broiler breeder female on incubation time and chick weight. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 1029-1036, 1997.
103. SUGIMOTO, Y. S.; OHSAKO, S.; et al. Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while changing its conformation and

- thermal stability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 11030-11037, 1999.
104. SUNNY, N. E.; BEQUETTE, B. J. Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos. **Journal of animal science**, v. 89, n. 12, p. 3945-3953, 2011.
 105. SUNNY, Nishanth Edakulathur. Integrating macronutrient metabolism in developing chicken embryos. 2008. Tese de Doutorado em Fisiologia, Universidade de Maryland.
 106. SWIATKIEWICZ, S.; KORELESKI, J. Effect of crude glycerin level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. **Poultry Science**, v. 88, n. 3, p. 615-619, mai 2009.
 107. TAKO, E.; FERKET, P. R.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 2023-2028, 2004.
 108. TALARICO, T. L. et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32, n. 12, p. 1854-1858, dez. 1988.
 109. TALARICO, Todd L. et al. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1, 3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 943-948, abr. 1990.
 110. TANURE, C. B. G. S. et al. Digestible Threonine Levels in the Starter Diet of Broilers Derived from Breeders of Different Ages. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 17, n. SPE, p. 31-37, dez. 2015.
 111. TAZAWA, H., et al. Metabolic responses of chicken embryos and hatchlings to altered O₂ environments. **Respiration physiology**, v. 88, n. 1-2, p. 37-50, jan. 1992.
 112. THOMMES, R. C., e J. J. JUST. Endocrine control of yolk sac membrane glycogen levels in the developing chick embryo. I. Glucagon. **Gen. Comp. Endocrinol.** 55:614-623, 1964.
 113. TOPAL, E.; OZDOGAN, M. Effects of glycerol on the growth performance, internal organ weights, and drumstick muscle of broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 1, p. 146-151, mar. 2013.
 114. ULMER-FRANCO, A. M.; FASENKO, G. M.; CHRISTOPHER, E. O. Dea. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. **Poultry science**, v. 89, n. 12, p. 2735-2742, 2010.

115. UNI, Z. et al. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, n. 5, p. 764-770, 2005.
116. UNI, Z.; FERKET, P. R. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. US Regular Patent US, US 8734837 B2, v. 6, p., 2003. Available from: <https://www.google.com/patents/US8734837>
117. UNI, Z.; FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**. v. 60, p. 101-111, mar. 2004.
118. VERNON, Ri G.; WALKER, D. G. Glycerol metabolism in the neonatal rat. **Biochemical Journal**, v. 118, n. 3, p. 531-536, 1970.
119. VIEIRA, S. L.; MORAN, E. T. Effects of delayed placement and used litter on broiler yields. **The journal of applied poultry research**, v. 8, n. 1, p. 75-81, mar. 1999.
120. VIEIRA, S. L.; MORAN, E. T. Effects of egg of origin and chick post-hatch nutrition on broiler live performance and meat yields. **World's Poultry Science Journal**, v. 55, n. 02, p. 125-142, jun. 1999.
121. VIEIRA, S. L.; MORAN, E. T. Eggs and chicks from broiler breeders of extremely different age. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 4, p. 372-376, 1998.
122. WANG, A. **The Effects of Different Feeding Program and Inclusion of Glycerol, Glucose or Sucrose in Broiler Starter Diets on Growth Performance and Intestinal Development**. Dissertação (Mestrado em Ciência)- Universidade de Dalhousie, Halifax, Nova Escócia, 2014 .
123. WARNER, J. D. et al. Effect of season, hatch time, and post-hatch holding on glycolgen status of turkey poults. In: **Poultry Science: POULTRY SCIENCE ASSOC INC**, 2006, Savoy, IL, USA. p. 56-57.
124. WILLIER, B. H. Glycogen synthesis, storage and transport mechanisms in the yolk-sac membrane of the chick embryo. **Wilhelm Roux'Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen**, v. 161, n. 2, p. 89-117, fev. 1968.
125. YADGARY, L.; UNI, Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. **Poultry science**, v. 91, n. 2, p. 444-453, fev. 2012.
126. YANG, C. M. et al. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. **Poultry science**, v. 91, n. 9, p. 2121-2129, set. 2012.
127. YU, B. et al. The effects of probiotic *Lactobacillus reuteri* Pg4 strain on intestinal characteristics and performance in broilers. **Asian australasian journal of animal sciences**, v. 20, n. 8, p. 1243, ago. 2007.

128. ZAKARIA, A. H.; MIYAKI, T.; IMAI, K. The effect of aging on the ovarian follicular growth in laying hens. **Poultry Science**, v. 62, n. 4, p. 670-674, 1983.

Capítulo 2

4.1. Periódico pretendido

Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.

4.2. Classificação Qualis Periódicos

A revistas é classificada como A2 e A1, respectivamente, nas áreas de avaliação Ciências Agrárias I e Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

GLICEROL *IN OVO* AFETA O ESTOQUE DE GLICOGÊNIO E O DESEMPENHO DE FRANGOS DE CORTE

G. C. Dal Pont¹, S. G. Oliveira¹, C. Rocha¹, A. Maiorka¹

1. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Paraná, Paraná, Brasil

Resumo

O glicerol é o principal substrato para produção de glicogênio pelo embrião de frango, o qual é a principal fonte energética nos últimos dias de incubação e durante a eclosão. O presente estudo teve como objetivo avaliar a utilização do glicerol na nutrição *in ovo* (IOF) em ovos de frango de corte leves e pesados oriundos de duas idades de matrizes. Para tal, foram realizados dois experimentos com 672 ovos cada. Os experimentos difeririam somente pela idade das reprodutoras, sendo utilizados ovos de matrizes com 32 e 60 semanas de idade, distribuídos ao acaso em 6 tratamentos, em arranjo fatorial 3x2, com 3 doses de glicerol (0, 6mg/ml e 12mg/ml) e 2 pesos de ovos (leves e pesados). Foram avaliadas variáveis de incubação, reservas de glicogênio, e após o nascimento realizado teste de desempenho até os 7 dias de idade. A eclodibilidade, período de morte embrionária e nascimentos precoces não foram influenciados pela inoculação do glicerol. Os pintinhos nascidos de ovos pesados (64,6 a 67,6g) do lote de 32 semanas apresentaram aumento da reserva de glicogênio hepático com a administração de 6mg/ml de glicerol. A administração de glicerol nos ovos de matrizes jovens melhorou consumo de ração e ganho de peso dos frangos aos 7 dias de idade. Já, os pintinhos das matrizes velhas apresentaram aumento no peso do fígado ao nascimento com a inoculação de 6mg/ml de glicerol. No entanto, não foi observado efeito do glicerol no desempenho da progênie do lote de 60 semanas. Assim, a utilização do glicerol na IOF é viável, pois não influenciou negativamente as variáveis de incubação, aumentou a deposição de glicogênio. Ainda, ele melhorou o desempenho de pintinhos de ovos de matrizes de 32 semanas, o que não aconteceu com ovos de matrizes mais velhas, sendo recomendado para ovos de lotes de matrizes mais jovens.

Palavras-chave: embrião, metabolismo energético, nutrição *in ovo*.

Introdução

O período perinatal dos frangos é caracterizado por mudanças fisiológicas e metabólicas drásticas, que incluem o início da respiração pulmonar, internalização do saco vitelino, uso do estoque de glicogênio, bicagem da casca e saída do ovo. O processo de eclosão é um momento crítico para o embrião, uma vez que é uma atividade longa e exaustiva, a qual requer muita energia em um momento marcado pela transição da respiração corialantóide para a pulmonar. Considerando o pouco oxigênio viável, o processo de β - oxidação dos ácidos graxos da gema não é suficiente para suprir a energia requerida pelo embrião (Moran, 2007), então, são utilizados como combustível os carboidratos armazenados na forma de glicogênio.

O estoque de glicogênio no fígado e músculos é essencial, não somente para a bicagem, quebra da casca e fase de emergência, mas, também, para a sobrevivência do pintinho até o acesso a água e comida, o que pode levar mais de 24 horas. Contudo, se o glicogênio estocado for insuficiente para o processo de eclosão, aminoácidos serão mobilizados do músculo peitoral para gliconeogênese (Vieira e Moran, 1999; Keirs et al., 2002). Devido a isso, maiores reservas de glicogênio evitam a degradação dos músculos (Uni et al., 2005) e estão associadas a maior peso na eclosão (John et al., 1988; Christensen et al., 2001).

Como forma de aumentar os nutrientes disponíveis para o embrião e estimular sua maturação digestiva iniciou-se as pesquisas de nutrição *intra ovo* ou *in ovo feeding* (IOF), sendo a técnica aperfeiçoada em pesquisas por Uni e Ferket (2003). O glicerol, já utilizado como ingrediente energético na alimentação de frangos de corte, desperta interesse na IOF, uma vez que, age como maior contribuinte para a gliconeogênese pelo embrião de frango (Sunny e Bequete, 2011) e é utilizado para produzir glicose sérica e glicogênio hepático e muscular (Sunny, 2008; Hu et al., 2016).

Com o envelhecer as matrizes de frango de corte aumentam o intervalo entre as ovulações e produzem ovos maiores. A maior quantidade de nutrientes nos ovos de lotes mais velhos resulta em pintinhos mais pesados (Suarez et al., 1997; O'Dea et al., 2004), os quais, apresentam também maior peso e ganho de peso com 21 e 41 dias (Ulmer-Franco et al., 2010; Nangsuay et al. 2016). Dessa forma, a nutrição *in ovo* pode ser utilizada para aumentar o aporte nutricional dos embriões de ovos pequenos, tentando reduzir sua disparidade com os pintinhos de ovos maiores.

Assim, o glicerol tende a ser um interessante composto para nutrição *in ovo* principalmente em ovos leves, uma vez que, ele pode aumentar as reservas de glicogênio do embrião e evitar o catabolismo muscular após a eclosão. Em vista disso e das poucas pesquisas com a substância na nutrição *in ovo*, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do glicerol como ingrediente na IOF aplicado em ovos de matrizes pesadas de 32 e 60 semanas de idade.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA SCA).

Seleção dos ovos e Incubação

Experimento I

Para o estudo foram utilizados 672 ovos oriundos de matrizes da linhagem Ross®, com 32 semanas de idade. Os ovos foram divididos em seis tratamentos que diferiram pela classificação de peso dos ovos e dosagem de glicerol aplicada (Tabela 1).

Para classificação dos ovos em leves e pesados foram pesados individualmente uma amostra de 100 ovos para cálculo da média e desvio padrão. O peso médio dos ovos foi de 61,62g, e o erro padrão foi utilizado para formar os intervalos, sendo classificados como ovos leves aqueles com mais de 55,62 e menos de 58,62g, e pesados os ovos com peso entre 64,62 e 67,62g.

Experimento II

Foram utilizados 672 ovos oriundos de matrizes da linhagem Ross®, com 60 semanas de idade. Os ovos foram divididos em seis tratamentos que diferiram pela classificação de peso dos ovos e dosagem de glicerol aplicada (Tabela 1).

Para classificação dos ovos em leves e pesados foram pesados individualmente uma amostra de 100 ovos para cálculo da média e desvio padrão. O peso médio dos ovos foi de 76,34g, e o erro padrão foi utilizado para formar os intervalos, sendo classificados como ovos leves aqueles com menos de 72g e pesados os com mais de 75,5g.

Em ambos experimentos os ovos trincados, deformados, sujos ou com qualquer característica indesejável para o processo de incubação foram descartados.

Os ovos foram fumigados com formaldeído na entrada do incubatório, onde permaneceram armazenados por 4 dias a 18°C. No dia em que iniciaria a incubação os ovos foram pré-aquecidos por 5 horas a temperatura de 24,5°C e incubados em incubadora, com 37,5°C e 65% de umidade. A distribuição na incubadora foi realizada de forma que cada bandeja de incubação apresentasse uma repetição (14 ovos) de cada tratamento. Aos dez dias de incubação foi realizada a ovoscopia para retirada dos ovos inférteis e com morte precoce.

Tratamentos Experimentais e Inoculação

Em ambos experimentos os ovos foram divididos em seis tratamentos com 8 repetições de 14 ovos cada. Os tratamentos tiveram como variáveis o peso dos ovos e a dosagem do glicerol inoculado (Tabela 1). As soluções inoculadas nos ovos foram preparadas com solução fisiológica (0.9%), glicerol Sigma® (≥99%), em equipamentos estéreis e capela de fluxo laminar horizontal com intuito de evitar possíveis contaminações microbiológicas. A solução fisiológica foi utilizada como diluente, sendo os tratamentos controles inoculados somente com a solução fisiológica.

As diluições injetadas foram previamente avaliadas quanto a osmolaridade e pH para que não ultrapassassem 800 Osm e não apresentassem pH menor que 4, o que poderia prejudicar o desenvolvimento embrionário. Sendo que a solução fisiológica base apresentou 308 osmolar e 6 de pH, a diluição de 6mg/ml e 12mg/ml de glicerol apresentaram 360 e 424 Osm e 6,25 e 6,39 de pH, respectivamente.

Aos 17º dias de desenvolvimento embrionário os ovos foram retirados da incubadora e levados para a sala de nutrição *in ovo*. A sala foi aquecida a 30°C e as soluções a 37°C para que não houvesse choque térmico para o embrião. Após desinfecção por aspersão de álcool 70% na região da câmara de ar, foi feita a perfuração da casca nessa extremidade, com o auxílio de um furador manual. Pelo orifício, inoculou-se 0,5ml da solução no líquido amniótico do embrião através de agulha estéril sem ponta de 3 cm x 0,3mm conectada a seringa de 1ml. Para auxiliar a injeção o posicionamento do embrião e do líquido amniótico foram observados através da realização de ovoscopia. Após a administração da solução os ovos foram transferidos para os nascedouros onde permaneceram em 36,5°C e umidade de 67%

até o 21º dia de incubação. Para evitar que os ovos perdessem calor em excesso, o tempo de permanência dos ovos na sala de inoculação não excedeu 2 horas.

Tabela 1. Tratamentos experimentais

	Idade da Matriz	Peso dos ovos	Solução <i>in ovo</i>
Experimento I	32 semanas	Leve	Sem Glicerol
	32 semanas	Leve	6mg/ml de Glicerol
	32 semanas	Leve	12mg/ml de Glicerol
	32 semanas	Pesado	Sem Glicerol
	32 semanas	Pesado	6mg/ml de Glicerol
	32 semanas	Pesado	12mg/ml de Glicerol
Experimento II	60 semanas	Leve	Sem Glicerol
	60 semanas	Leve	6mg/ml de Glicerol
	60 semanas	Leve	12mg/ml de Glicerol
	60 semanas	Pesado	Sem Glicerol
	60 semanas	Pesado	6mg/ml de Glicerol
	60 semanas	Pesado	12mg/ml de Glicerol

Nascimento

Para avaliação dos nascimentos precoces ao completar 480 horas de incubação, os nascedouros foram abertos, e os animais que já haviam nascido foram contabilizados e identificados.

Quando os ovos completaram 500 horas de incubação, um pintinho macho de cada repetição foi retirado do nascedouro e eutanasiado para quantificação de retenção de gema, peso de fígado, e coleta de músculo de peito e fígado para quantificação de glicogênio.

Como padrão de período de incubação, foi considerado 504 horas (21 dias), sendo que completando esse período os nascedouros foram abertos para a retirada de todos animais. A eclodibilidade foi determinada pelo número de pintinhos nascidos em relação aos ovos férteis. As aves que apresentaram umbigo mal cicatrizado e comportamento letárgico não foram utilizadas para o experimento de desempenho. Após pesagem dos pintinhos de cada repetição os animais foram sexados, por meio do empenamento das asas.

Os ovos não eclodidos ao final do 21º dia de incubação foram avaliados para determinação do dia da mortalidade com base no desenvolvimento embrionário.

Avaliação de glicogênio hepático e muscular

O fígado e músculo de peito dos animais abatidos ao nascimento foram coletados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer (-20°C) e realizada análise de glicogênio segundo metodologia descrita por Hassid e Abrahams (1957).

Avaliação de Desempenho

Para ensaio de desempenho 252 pintinhos foram alojados em gaiolas de 0,98 x 0,45 x 0,50m (c x l x h), equipadas com comedouro e bebedouro tipo calha, até os 7 dias de idade. Foi fornecida uma dieta aos animais para fase pré-inicial (1 a 7 dias), sendo a ração idêntica para todos os tratamentos e formulada à base de milho e farelo de soja, segundo as exigências nutricionais (Rostagno et al. 2017). O controle ambiental foi realizado segundo recomendações da linhagem.

No alojamento e aos sete dias os animais e a ração presente nos comedouros foram pesados para avaliação do consumo de ração, ganho de peso, e índice de conversão alimentar.

Também, aos 7 dias de idade um animal de cada repetição foi eutanasiado por deslocamento da cervical, para mensuração de peso de fígado e peito.

Delineamento experimental e estatística

O delineamento dos dois experimentos foi inteiramente ao acaso decomposto em modelo fatorial 2x3 (2 categorias de peso: leve e pesado; 3 doses de glicerol: 0, 6mg/ml e 12mg/ml de glicerol) totalizando seis tratamentos.

Para incubação foram utilizados para cada tratamento oito repetições de 14 ovos cada, totalizando 672 ovos incubados em cada experimento. Já para o ensaio de desempenho os animais foram alojados em sete repetições de seis animais cada, totalizando 252 aves.

Os dados coletados foram submetidos à análise de homogeneidade das variâncias (Teste de Bartlett) e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk). Após verificada a distribuição normal e ausência de dados discrepantes, os dados foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) seguindo esquema fatorial 2x3, e na presença de diferença estatística entre os tratamentos comparadas as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados que não apresentaram normalidade, como a eclodibilidade, animais nascidos precoces e peso dos pintinhos ao nascer, ou aqueles não paramétricos, como o período de morte embrionária, foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis.

Resultados

Experimento I

A inoculação de glicerol nos ovos de matrizes de 32 semanas não prejudicou a eclodibilidade, independente do tamanho dos ovos (Tabela 2). Na avaliação de embriodiagnóstico dos ovos não eclodidos não houve diferença no período de morte embrionária ($P=0,799$; dados não apresentados), tal como a utilização de glicerol *in ovo* não influenciou no número de animais nascidos precocemente ($P=0,404$; dados não apresentados). No entanto, a administração do glicerol parece ter melhorado o peso dos animais nascidos de ovos leves.

Os resultados encontrados para peso de saco da gema, peso do fígado e reserva de glicogênio hepático e muscular estão apresentados na Tabela 3. A utilização do conteúdo do saco da gema não foi influenciada pela administração de glicerol *in ovo*, no entanto os pintinhos oriundos de ovos leves apresentaram saco da gema menor que os nascidos de ovos pesados ($P=0,01$). O peso do fígado não foi influenciado pelos tratamentos, no entanto, houve interação entre dose e tamanho dos ovos para reserva de açúcar no fígado, e a inoculação de 6mg/ml de glicerol em ovos pesados proporcionou aumento nas reservas de glicogênio hepático, enquanto que nos ovos leves não foi notada diferença com a inoculação. Os ovos maiores produziram pintinhos com maior quantidade de glicogênio armazenado no fígado que os ovos leves ($P<0,05$). Contudo, as reservas de glicogênio presentes no músculo do peito não foram afetadas pela inoculação de glicerol nem pelo peso dos ovos.

Os resultados de peso de peito e fígado, e desempenho aos 7 dias de idade estão descritos na Tabela 4. O peso de peito não foi influenciado por nenhum dos tratamentos experimentais, já o peso do fígado foi maior nos animais nascidos de ovos mais pesados. A inoculação de glicerol *in ovo* mostrou efeitos positivos no desempenho dos frangos de corte aos 7 dias, com aumento do consumo de ração e

ganho de peso ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente), enquanto que a conversão alimentar não foi afetada pelo peso dos ovos nem IOF

Tabela 2. Medianas da Eclodibilidade (%) e Peso de Pintinhos (g) ao nascimento oriundos de ovos de matrizes com 32 semanas inoculados com glicerol.

Tratamentos			Eclodibilidade (%)	Peso (g)
Idade matriz	Peso ovo	Glicerol (mg/ml)		
32 semanas	Leve	0	80%	40,2 ^b
		6	80%	42,0 ^{ab}
		12	90%	40,5 ^{ab}
	Pesado	0	80%	48,7 ^a
		6	65%	48,6 ^a
		12	80%	48,5 ^a
P-value			0,5413	<0,001

Tabela 3. Peso de Gema Residual (g), Peso de Fígado (g), Glicogênio hepático (mg/g), e Glicogênio no Músculo do Peito (mg/g) de pintinhos ao nascimento oriundos de ovos de matrizes com 32 semanas inoculados com glicerol.

		Gema residual (g)	Fígado (g)	Glicogênio hepático (mg/g)	Glicogênio muscular (mg/g)
Peso	Dose (mg/ml)				
Leve	0	7,46	0,727	13,60 ^{ab}	6,85
	6	6,23	0,781	11,51 ^b	7,57
	12	6,11	0,770	12,75 ^b	6,35
Pesado	0	8,32	0,747	12,87 ^b	6,92
	6	9,35	0,775	17,15 ^a	6,07
	12	8,76	0,862	12,75 ^b	5,56
Dose					
	0	7,89	0,816	13,24	6,89
	6	7,79	0,778	14,33	6,82
	12	7,44	0,737	12,67	5,95
Peso					
	Leve	6,60	0,759	12,57	6,92
	Pesado	8,81	0,795	14,26	6,18
	CV%	17,84	13,46	18,13	21,40
	P-value dose	0,735	0,212	0,251	0,208
	P-value peso	0,001	0,328	0,045	0,123
	P-value dose*peso	0,148	0,516	0,006	0,407

Tabela 4. Peso de Peito (g), Peso de Fígado (g), Consumo Médio de Ração (CMR, g), Ganho de Peso Médio (GPM, g) e Conversão Alimentar (CA, g) de frangos de corte com 7 dias nascidos de ovos de matrizes com 32 semanas inoculados com glicerol.

		Peito (g)	Fígado (g)	CMR (g)	GPM (g)	CA
Peso	Dose (mg/ml)					
Leve	0	11,40	6,04	77,3	61,6	1,223
	6	13,05	5,56	86,5	69,7	1,246
	12	11,14	6,68	90,7	73,3	1,220
Pesado	0	11,95	6,54	84,9	68,9	1,217
	6	13,82	7,95	95,3	76,1	1,266
	12	12,79	6,86	91,7	71,6	1,258
Dose						
	0	11,68	6,29	81,1 ^b	65,3 ^b	1,220
	6	13,44	6,76	90,9 ^a	72,9 ^a	1,256
	12	11,96	6,77	91,2 ^a	72,4 ^a	1,239
Peso						
	Leve	11,86	6,10	84,8	68,2	1,230
	Pesado	12,85	7,12	90,6	72,2	1,247
	CV%	15,44	16,40	7,71	9,14	4,50
	P-value dose	0,130	0,570	0,0007	0,009	0,274
	P-value peso	0,187	0,021	0,012	0,067	0,346
	P-value dose*peso	0,810	0,074	0,313	0,182	0,628

Experimento II

A eclodibilidade (Tabela 5) não foi influenciada pela inoculação do glicerol ou pelo peso dos ovos, tal como período de morte embrionária e número de animais nascidos precocemente ($P=0,059$ e $P=0,496$, respectivamente; dados não apresentados). Já, o peso dos animais (Tabela 5), como no experimento I foi maior nos animais oriundos de ovos pesados ($P<0,001$).

O peso do saco de gema e do fígado e a quantidade de glicogênio hepático e muscular após a eclosão estão expressos na Tabela 6. A absorção do saco da gema após o nascimento não foi alterada pela inoculação de glicerol, no entanto, como a progênie de matrizes de 32 semanas, os pintinhos de ovos maiores apresentaram maior peso de saco de gema. A utilização de 6mg/ml de glicerol na IOF aumentou o peso de fígado ($P<0,001$). Contudo, as reservas de glicogênio hepático e muscular não foram afetadas pelos tratamentos.

Tabela 5. Medianas da Eclodibilidade (%) e Peso de Pintinhos ao nascimento oriundos de ovos de matrizes com 60 semanas inoculados com glicerol.

Tratamentos		Eclodibilidade		Peso
idade matriz	Peso ovo	Glicerol (mg/ml)	(%)	(g)
60 semanas	Leve	0	75%	51,38 ^b
		6	60%	51,19 ^b
		12	50%	51,11 ^b
	Pesado	0	50%	57,14 ^a
		6	50%	56,39 ^{ab}
		12	70%	57,0 ^a
P-value		0,7542	<0,001	

Tabela 6. Peso de Gema Residual (g), Peso de Fígado (g), Glicogênio hepático (mg/g) e Glicogênio no Músculo do Peito (mg/g) de pintinhos ao nascimento oriundos de ovos de matrizes com 60 semanas inoculados com glicerol.

		Gema residual (g)	Fígado (g)	Glicogênio hepático (mg/g)	Glicogênio muscular (mg/g)
Peso	Dose (mg/ml)				
Leve	0	10,39	0,876	13,15	6,65
	6	9,67	0,993	13,01	5,90
	12	9,89	0,780	13,23	5,23
Pesado	0	11,07	0,824	13,06	6,56
	6	10,99	1,035	10,90	5,49
	12	11,85	0,800	14,93	6,22
Dose					
	0	10,73	0,850 ^b	13,11	6,61
	6	10,33	1,014 ^a	11,46	5,70
	12	10,87	0,790 ^b	14,08	5,73
Peso					
	Leve	9,99	0,883	12,79	5,93
	Pesado	11,30	0,887	12,96	6,09
	CV%	15,41	13,91	37,47	20,43
	P-value dose	0,736	0,0009	0,415	0,137
	P-value peso	0,032	0,935	0,916	0,688
	P-value dose*peso	0,678	0,663	0,774	0,354

Os parâmetros de peso de peito e fígado e de desempenho dos frangos aos 7 dias de idade estão expressos na Tabela 7. Peso de peito e fígado não foram afetados pelo peso dos ovos ou dose de glicerol. Os pintinhos oriundos de ovos de matrizes com 60 semanas não apresentaram melhora de desempenho com a inoculação de glicerol, no entanto, os animais nascidos de ovos pesados apresentaram maior

consumo de ração, porém pior conversão alimentar aos 7 dias de idade quando comparados aos pintinhos nascidos de ovos leves.

Tabela 7. Peso de Peito (g), Relação de Peito (%), Peso de Fígado (g), Consumo Médio de Ração (CMR, g), Ganho de Peso Médio (GPM, g) e Conversão Alimentar (CA) de frangos de corte com 7 dias de idade nascidos de ovos de matrizes de 60 semanas inoculados com diferentes níveis de glicerol.

		Peito (g)	Fígado (g)	CMR (g)	GPM (g)	CA
Peso	Dose (mg/ml)					
Leve	0	7,44	7,44	97,1	79,1	1,21
	6	8,15	8,15	94,3	71,8	1,25
	12	6,93	6,93	93,4	750	1,22
Pesado	0	7,50	7,50	99,1	78,2	1,29
	6	8,27	8,27	102,4	80,4	1,28
	12	8,93	8,93	100,5	80,7	1,24
Dose						
	0	7,41	7,47	98,1	78,7	1,25
	6	8,21	8,21	98,3	76,1	1,27
	12	7,93	7,93	97,0	77,9	1,23
Peso						
	Leve	7,50	7,50	94,9	75,3	1,23
	Pesado	8,23	8,23	100,7	79,8	1,27
	CV%	16,33	16,92	8,44	9,44	3,49
	P-value dose	0,310	0,482	0,904	0,688	0,158
	P-value peso	0,363	0,165	0,043	0,076	0,007
	P-value dose*peso	0,217	0,234	0,626	0,281	0,282

Discussão

A eclodibilidade, tal como período de morte embrionária e o número de nascimentos precoces não foram prejudicados pela inoculação de glicerol nos ovos embrionados de matrizes de 32 ou 60 semanas, mostrando que o glicerol pode ser utilizado como ingrediente na IOF até 12mg/ml sem efeitos negativos no período de incubação, nascimento e primeira semana pós-eclosão. Entretanto, tais dados não corroboram com os resultados encontrados por Neves et al. (2016), que observaram diminuição na eclodibilidade e maior morte embrionária após a inoculação 2,3 e 4,6µg/ml de glicerol, concentração menor que a utilizada nos dois experimentos deste trabalho. Contudo, no presente estudo não houve a utilização de um grupo sem inoculação, o que se mostra necessário para avaliar o efeito da técnica de IOF, uma vez que, Retes et al. (2017) observaram que 17% dos estudos que utilizaram solução

salina como diluente para soluções *in ovo* apresentaram diminuição de eclodibilidade quando comparado a ovos intactos.

O glicerol é o principal substrato para a formação de glicogênio hepático no embrião de frango (Sunny e Bequete, 2011), o qual vai ser utilizado como fonte energética nos últimos dias de incubação e durante a eclosão. Contudo, ao contrário do esperado, no presente trabalho a inoculação do glicerol não diminuiu a utilização do saco da gema, como observado por Zhai et al. (2011) com a inoculação de diferentes carboidratos. Neves et al. (2016) e Rocha et al. (2013) observaram efeito quadrático dos níveis de glicerol inoculados em ovos embrionados sobre o peso do saco da gema após o nascimento.

O peso do fígado, principal local de reserva de glicogênio, não foi influenciado pela inoculação de glicerol em pintinhos de ovos de matrizes jovens. Porém, houve interação entre dose de glicerol inoculado e peso dos ovos na deposição de glicogênio hepático em pintinhos provenientes de matrizes com 32 semanas de idade (Experimento I). Os pintinhos nascidos de ovos pesados de matrizes jovens inoculados com 6mg/ml de glicerol armazenaram mais glicogênio no fígado. Como a utilização do glicerol pelo embrião é maior no terço final da incubação, tanto para formação de aminoácidos gliconeogênicos quanto para gliconeogênese (Hu et al., 2016), essas vias metabólicas mais ativas no período após IOF provavelmente proporcionaram a conversão do glicerol inoculado em glicogênio pelo fígado, aumentando seus estoques. Já foi observado, também, que a inoculação *in ovo* de doses crescentes de glicerol provocou aumento linear na atividade da enzima glicerol quinase hepática (Neves et al., 2016), envolvida no metabolismo da substância no fígado, demonstrando que o glicerol injetado na IOF consegue ser metabolizado pelo embrião da ave.

Pintinhos nascidos de matrizes de 60 semanas (Experimento II) apresentaram aumento do peso do fígado com a administração de 6mg/ml de glicerol, o que sugere maiores reservas energéticas. No entanto, a deposição de glicogênio em tecido hepático não foi influenciada pela IOF, nem pelo tamanho dos ovos.

A capacidade de metabolização do glicerol é limitada pelas enzimas glicerol quinase (Vernon e Walker, 1970) e hidroxiketona fosfato desidrogenase (Lin et al., 1976), sendo já observado em frangos de corte que a capacidade de utilização da substância é de 7,5% de glicerol na dieta (Romano et al. 2014). Observando o

comportamento dos dados de glicogênio hepático no Experimento I e de peso de fígado no Experimento II há o indicativo que entre as duas doses aplicadas de glicerol, 6 e 12 mg/ml, encontra-se o platô de metabolização da substância.

No entanto, nos dois experimentos não foi observado interação ou influência dos tratamentos na reserva de glicogênio no músculo peitoral, demonstrando que o glicerol não foi utilizado para a formação de glicogênio muscular. Como, o sangue oriundo do trato digestivo do embrião passa primeiramente pelo fígado (Romanoff, 1960) e este é o principal órgão conversor de glicerol em glicogênio (Sunny, 2008; Berg e Stryer et al., 2008), provavelmente o glicerol inoculado, após absorvido pelo embrião, foi utilizado primeiramente para a produção de glicogênio no próprio fígado sem aumento das reservas musculares.

Quando as reservas de carboidratos do embrião são esgotadas, os aminoácidos do músculo do peito se tornam o principal substrato para gliconeogênese (Keirs et al., 2002), o que resulta em perda protéica indesejada. O glicerol além de precursor da síntese de glicose e glicogênio no embrião também é convertido em alanina, aspartato e glutamina (Sunny e Bequette, 2011), aminoácidos gliconeogênicos, podendo atuar como poupador de aminoácidos musculares. Contudo, não foi observado esse efeito, não havendo diferença no peso de peito das aves submetidas a IOF com glicerol aos 7 dias de idade em ambos experimentos.

A administração de glicerol no ovo teve efeito no desempenho zootécnico dos frangos de corte nascidos de matrizes jovens aos 7 dias de idade (Experimento I). Sendo o CMR e GPM maiores nos animais que deglutiram líquido amniótico contendo o glicerol quando ainda eram embriões. De maneira semelhante, Rocha et al. (2013) observaram que aos 7 dias de idade pintinhos de matrizes de 39 semanas inoculados com glicerol aumentaram o consumo de ração de maneira linear e mostraram efeito quadrático para ganho de peso. Esse efeito pode ser oriundo da maior reserva energética desses animais, que manteve os níveis séricos de glicose durante o tempo entre o nascimento até o alojamento, proporcionando a chegada de pintinhos mais ativos, consumindo mais água e ração, afetando por consequência o ganho de peso. Kornasio et al. (2011) também observaram maior ganho de peso em pintinhos que apresentaram maiores reservas de glicogênio após 24h de nascidos, o que os pesquisadores atribuíram ao maior desenvolvimento de tecidos fundamentais pela maior quantidade de reservas e menor utilização dos músculos como fonte energética.

Além disso, Neves (2016) observou aumento na altura dos vilos e profundidade das criptas no epitélio intestinal com a inoculação de glicerol, o que pode melhorar o aproveitamento da dieta auxiliando no ganho de peso.

Como o peso aos 7 dias tem correlação positiva com o peso aos 42 dias de idade dos frangos de corte (Tona et al., 2004; Willemsen et al., 2008), os animais inoculados com glicerol podem demonstrar até a idade de abate maior peso, sendo necessárias pesquisas em que levem o ensaio de desempenho até próximo do peso do abate para comprovar essa hipótese.

Contudo, os pintinhos nascidos de ovos de matrizes velhas não demonstraram resposta semelhante. Sendo que o desempenho e a deposição de glicogênio destes não foi influenciado pela inoculação de glicerol. Sunny (2008) observou que ovos menores apresentaram maior conversão de glicerol administrado no ovo em glicose sérica que ovos maiores. Essa diferença foi justificada pela menor quantidade de sólidos na gema, e assim menor quantidade de glicerol disponível ao embrião. Uma vez que, no presente estudo os ovos de galinhas de 60 semanas foram mais pesados que os do lote de matrizes jovens, provavelmente a maior quantidade de substrato para a formação das reservas energéticas fez com que os embriões de matrizes mais velhas não se beneficiassem pelo aporte de glicerol da inoculação *in ovo*.

O tamanho dos ovos de matrizes de 32 semanas influenciou o peso do resíduo do vitelo no dia do nascimento, sendo que os pintinhos nascidos de ovos mais pesados apresentaram maior resíduo de gema. Achados semelhantes foram observados por Nangasuay et al. (2011), sendo que a maior quantidade de gema residual provavelmente decorre pela maior quantidade de gema depositada nos ovos maiores. Sunny (2008) observou que embriões de ovos grandes e pequenos possuem taxas similares de gliconeogênese e eficiência energética, e concluiu que a diferença na quantidade de nutrientes viáveis nos ovos é a causa da variação de peso entre os pintinhos. Dessa forma, a maior quantidade de substrato nos ovos pesados também deve ter propiciado o maior depósito de glicogênio no fígado desses animais. Além de serem animais maiores, a maior quantidade de reserva energética provavelmente possibilitou chegarem mais ativos no alojamento impactando no maior consumo de ração.

Os pintinhos oriundos de ovos pesados de matrizes de 60 semanas também apresentaram maior peso ao nascimento e gema residual, no entanto, não houve

diferença na deposição de glicogênio no fígado. No desempenho os pintinhos maiores apresentaram maior consumo de ração, contudo pior conversão alimentar que os animais nascidos de ovos leves.

Conclusão

O glicerol inoculado nos ovos embrionados de frango de corte não provocou redução dos parâmetros de incubação, sendo passível de utilização na nutrição *in ovo*. Os embriões metabolizaram o glicerol administrado aumentando as reservas de glicogênio hepático, sendo que seu platô de metabolização parece se encontrar entre 6 e 12mg de glicerol/ml de solução.

A inoculação de glicerol no 17º de desenvolvimento embrionário pode ser utilizada como prática para melhorar o desempenho de pintinhos de lotes de matrizes jovens, enquanto que sua administração em ovos de lotes de matrizes velhas não demonstrou os mesmos benefícios.

Referências

1. Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L. 2004: Bioquímica. 5.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
2. Christensen, V. L., Wineland, M. J., Fasenko, G. M., & Donaldson, W. E. 2001: Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. *Poultry Science*, 80(12): 1729-1735. <https://doi.org/10.1093/ps/80.12.1729>
3. Hassid, W. Z.; Abraham, S. 1957: [7] Chemical procedures for analysis of polysaccharides. v. 3, p. 34-38.
4. Hu, Q., Agarwal, U., & Bequette, B. J. 2016: Gluconeogenesis, non-essential amino acid synthesis and substrate partitioning in chicken embryos during later development. *Poultry science*, 96(2): 414-424. <https://doi.org/10.3382/ps/pew249>
5. John, T. M., George, J. C., & Moran Jr, E. T. 1988: Metabolic changes in pectoral muscle and liver of turkey embryos in relation to hatching: influence of glucose and

- antibiotic-treatment of eggs. *Poultry Science*, 67(3): 463-469. <https://doi.org/10.3382/ps.0670463>
6. Keirs, R. W., Peebles, E. D., Hubbard, S. A., & Whitmarsh, S. K. 2002: Effects of supportive gluconeogenic substances on the early performance of broilers under adequate brooding conditions. *Journal of applied poultry research*, 11(4): 367-372. <https://doi.org/10.1093/japr/11.4.367>
 7. Kornasio, R., Halevy, O., Kedar, O., & Uni, Z. 2011: Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. *Poultry Science*, 90(7): 1467-1477. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01080>
 8. Lin, M. H., Romsos, D. R., & Leveille, G. A. 1976: Effect of glycerol on lipogenic enzyme activities and on fatty acid synthesis in the rat and chicken. *The Journal of nutrition*, 106(11): 1668-1677. <https://doi.org/10.1093/jn/106.11.1668>
 9. Moran JR, E. T. 2007: Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. *Poultry Science*, v. 86: p.1043-1049. <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1043>
 10. Nangsuay, A., Meijerhof, R., Van den Anker, I., Heetkamp, M. J. W., Morita, V. D. S., Kemp, B., & Van Den Brand, H. 2016: Effects of breeder age, broiler strain, and eggshell temperature on development and physiological status of embryos and hatchlings. *Poultry science*, 95(7): 1666-1679. <https://doi.org/10.3382/ps/pew080>
 11. Nangsuay, Y., Ruangpanit, R., Meijerhof, S., Attamangkune. 2011: Yolk absorption and embryo development of small and large eggs originating from young and old breeder hens, *Poultry Science*, 2648–2655. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01415>
 12. Neves, D. G., Retes, P. L., Rocha, R. R., Ferreira, L. G., Naves, L. P., Alvarenga, R. R., ... & Zangeronimo, M. G. 2016: Effects of in ovo feeding with glycerol for broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(3): 434-440. <https://doi.org/10.1111/jpn.12578>

13. O'Dea, E. E., Fassenko, G. M., Feddes, J. J. R., Robinson, F. E., Segura, J. C., Ouellette, C. A., & Van Middelkoop, J. H. 2004: Investigating the eggshell conductance and embryonic metabolism of modern and unselected domestic avian genetic strains at two flock ages. *Poultry science*, 83(12): 2059-2070. <https://doi.org/10.1093/ps/83.12.2059>

14. Retes PL, Clemente AHS, Neves DG, et al. 2017: *In ovo* feeding of carbohydrates for broilers—a systematic review. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 00:1–9. <https://doi.org/10.1111/jpn.12807>

15. Rocha, C., Bueno, I. J. M., Carneiro, C. E. O., Barilli, L. N. E., Santos, R. O. F., Maiorka, A., & Dahlke, F. 2013: In ovo feeding of glycerol to broiler chickens. In *24th Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, Australia, 17-20 February 2013* (pp. 159-161). Poultry Research Foundation.

16. Romano, GG, Menten, JFM, Freitas, LW, Lima, MB, Pereira, R, Zavarize, KC, & Dias, CTS. 2014: Effects of glycerol on the metabolism of broilers fed increasing glycerine levels. *Revista Bras. de Ciên. Avícola*, 16(1), 97-105. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-635X2014000100014>

17. Romanoff, A.L. 1960: The avian embryo; structural and functional development Macmillan, New York, NY.

18. Rostagno, H S, Albino, LFT, Hannas, MI, Donzele, JL, Sakomura, NK, Perazzo, FG, Saraiva, A, Abreu, MLT, Rodrigues, PB, Oliveira RF, Barreto SLT, & Brito CO. 2017: Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Viçosa: UFV.

19. Suarez, M. E., Wilson, H. R., Mather, F. B., Wilcox, C. J., & McPherson, B. N. 1997: Effect of strain and age of the broiler breeder female on incubation time and chick weight. *Poultry Science*, 76(7): 1029-1036. <https://doi.org/10.1093/ps/76.7.1029>

20. Sunny, N. E., & Bequette, B. J. 2011: Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken

- embryos. *Journal of animal science*, 89(12): 3945-3953.
<https://doi.org/10.2527/jas.2011-3985>
21. Sunny, Nishanth Edakulathur. Integrating macronutrient metabolism in developing chicken embryos. 2008: Tese de Doutorado em Fisiologia, Universidade de Maryland.
 22. Tona, K., O. Onagbesan, B. De Ketelaere, E. Decuypere, and V. Bruggeman. 2004: Effects of age of broiler breeders on egg quality, hatchability, chick quality chick weight and chick post-hatch growth to 24 days. *J. Appl. Poult. Res.* 13:10–18.
<https://doi.org/10.1093/japr/13.1.10>
 23. Ulmer-franco, A. M.; Fassenko, G. M.; Christopher, EE O.'Dea. 2010: Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. *Poultry science*, v. 89: 2735-2742.
<https://doi.org/10.3382/ps.2009-00403>
 24. Uni, Z., Ferket, P. R., Tako, E., & Kedar, O. 2005: In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. *Poultry Science*, 84(5), 764-770.
<https://doi.org/10.1093/ps/84.5.764>
 25. Uni, Z.; Ferket, P. R. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. US Regular Patent US, US 8734837 B2, v. 6, p., 2003. Available from:
<https://www.google.com/patents/US8734837>
 26. Vernon, R. G., & Walker, D. G. 1970: Glycerol metabolism in the neonatal rat. *Biochemical Journal*, 118(3): 531-536. <https://doi.org/10.1042/bj1180531>
 27. Vieira, S. L., & Moran, E. T. 1999: Effects of egg of origin and chick post-hatch nutrition on broiler live performance and meat yields. *World's Poultry Science Journal*, 55(2): 125-142. <https://doi.org/10.1079/WPS19990009>
 28. Willemsen, N H.. Everaert, A. Witters, L. De Smit, M. Debonne, F. Verschuere, P. Garain, D. Berckmans, E. Decuypere, V. Bruggeman. 2008: Critical Assessment of

Chick Quality Measurements as an Indicator of Posthatch Performance, *Poultry Science*, Issue 11: 2358–2366. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00095>.

29. Zhai, W., Gerard, P. D., Pulikanti, R., & Peebles, E. D. 2011: Effects of in ovo injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings 1 2. *Poultry science*, 90(10): 2134-2143. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01418>

Capítulo 3

5.1. Periódico pretendido

Poultry Science Journal.

5.2. Classificação Qualis Periódicos

A revistas é classificada como A2 e A1, respectivamente, nas áreas de avaliação Ciências Agrárias I e Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

INOCULAÇÃO DE GLICEROL EM OVOS DE MATRIZES PESADAS JOVENS EM DIFERENTES FASES DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

G. C. Dal Pont *, S. G. Oliveira *, C. Rocha*, A. Maiorka*

*Universidade Federal do Paraná

RESUMO

Ovos leves apresentam menor quantidade de conteúdo para utilização pelo embrião, sendo o glicerol proveniente dos triglicerídeos da gema o maior substrato para produção de glicogênio utilizado como fonte energética nos últimos dias de incubação e durante a eclosão. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar a inoculação de glicerol em diferentes dias em ovos leves. Para tanto, foram incubados 336 ovos leves (55,6 a 58,6g) de matrizes de frango de corte de 32 semanas de idade. Os ovos foram distribuídos de maneira inteiramente casualizada em três tratamentos: inoculados com solução fisiológica aos 17 dias de incubação (E17), inoculados aos E17 com solução de 6mg/ml de glicerol e inoculados aos 18 dias de incubação (E18) com 6mg/ml de glicerol. Foram avaliados parâmetros de incubação, glicogênio hepático e muscular e desempenho zootécnico aos 7 dias de idade das aves. A inoculação de glicerol não influenciou a eclodibilidade, período de morte embrionária e nascimentos precoces. Os pintinhos inoculados com glicerol apresentaram maior utilização do conteúdo do saco da gema. Os animais que receberam glicerol aos E18 tiveram maior deposição de glicogênio hepático ($P=0,001$) quando comparados aos demais tratamentos, bem como, apresentaram maior consumo de ração e ganho de peso aos 7 dias de idade ($P<0,05$). Assim, observou-se que a inoculação de glicerol *in ovo* contribuiu para a formação das reservas de glicogênio hepático e melhorou índices de desempenho quando inoculado no 18º dia de incubação.

Palavras-chaves: embrião, glicogênio, incubação, nutrição *in ovo*.

INTRODUÇÃO

Os embriões dos frangos de corte têm seu desenvolvimento e crescimento dependente do conteúdo depositado no ovo pelas matrizes. Já foi observado que embriões provenientes de ovos pequenos apresentam limitação do seu desenvolvimento devido a menor quantidade de nutrientes presente no ovo, gerando atraso de crescimento a partir do 8º dia de incubação (McLoughlin e Gous, 2000). Buscando aumentar o aporte para o desenvolvimento embrionário e gerar pintinhos mais preparados para a fase pós-eclosão iniciou-se as tentativas de alimentação ainda no ovo nomeadas nutrição *in ovo* ou *in ovo feeding* (IOF). A metodologia foi aperfeiçoada em pesquisas por Uni e Ferket (2003), que demonstraram que o local preferencial para a injeção da solução nutritiva é o líquido amniótico entre o 17º (E17) e 18º (E18) dia de desenvolvimento embrionário.

As reservas de glicogênio são a principal fonte de energia para o pintinho durante o exaustivo processo de eclosão, já que a pouca oxigenação nesse período reduz a β -oxidação dos ácidos graxos da gema (Moran, 2007). Sendo o estoque de glicogênio no fígado e músculos essencial, não somente para a bicagem, quebra e emergência, mas, também, para a sobrevivência do pintinho até o acesso a água e comida, o que pode levar mais de 24 horas. Como maiores reservas de glicogênio já foram associadas a maior peso na eclosão (John et al., 1988; Christensen et al., 2001) busca-se ingredientes para IOF que possam aumentar a deposição do açúcar pelo embrião.

O glicerol é um composto orgânico de função álcool, presente nos triglicerídeos da gema, sendo liberado quando o embrião utiliza das gorduras como fonte energética. Quando disponibilizado, após a hidrólise dos triglicerídeos, o glicerol é utilizado como principal substrato para a formação do glicogênio hepático pelo embrião (Sunny e Bequette, 2011). Assim, a aplicação do glicerol como ingrediente na nutrição *in ovo* parece interessante, tendo em vista o possível aumento das reservas energéticas do embrião.

Além de encontrar ingredientes que melhorem o estado energético do embrião, é necessário que a técnica da IOF possa ser aplicada em conjunto com as práticas de manejo vigentes nos incubatórios comerciais. Na maioria dos incubatórios a transferência dos ovos da incubadora para o nascedouro e a realização da vacinação *in ovo* ocorrem entre o 18º e 19º dia de incubação, sendo esse momento o mais

favorável para execução da nutrição *in ovo*. No entanto, a maioria dos estudos com a técnica da IOF foram realizados no 17º dia de incubação com foco no ingrediente administrado e não no dia de desenvolvimento embrionário.

Tendo em vista, a possível contribuição da administração do glicerol *in ovo* para aumentar as reservas de glicogênio do embrião, e a necessidade de tornar a técnica viável a implantação nos incubatórios, esse estudo teve como objetivo avaliar a inoculação de glicerol em ovos leves de frango de corte aos E17 e E18 sobre parâmetros de incubação, reservas de glicogênio e desempenho zootécnico dos animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA SCA) da Universidade Federal do Paraná (006/2017).

Seleção dos ovos e Incubação

Para o estudo foram utilizados 336 ovos considerados leves oriundos de matrizes da linhagem Ross®, com 32 semanas de idade. Os ovos foram divididos em três tratamentos que diferiram pelo estágio de desenvolvimento embrionário em que foi realizada a nutrição *in ovo* (E17 e E18) e pela concentração de glicerol inoculada (0 e 6mg/ml de glicerol) (Tabela 8).

Para classificação dos ovos em leves foram pesados individualmente 100 ovos para cálculo da média e desvio padrão (S). O peso médio dos ovos foi de 61,62g, e o desvio padrão foi utilizado para classificar os ovos, sendo considerados ovos leves aqueles com mais de 55,62 e menos de 58,62g. Os ovos trincados, deformados, sujos ou com qualquer característica indesejável para o processo de incubação foram descartados.

Os ovos foram fumigados com formaldeído na entrada do incubatório, onde permaneceram armazenados por 4 dias a 18°C. No dia em que iniciaria a incubação os ovos foram pré-aquecidos por 5 horas a temperatura de 24,5°C e incubados em incubadora, a 37,5° C e 65% de umidade.

Tabela 8. Tratamentos Experimentais

Tratamento	Dia da Inoculação	Solução
0 Glic- 17ºd IOF	E17	0 mg/ml de glicerol (controle)
6 Glic- 17ºd IOF	E17	6 mg/ml de glicerol
6 Glic- 18ºd IOF	E18	6 mg/ml de glicerol

E17: 17º dia de desenvolvimento embrionário, E18: 18º dia de desenvolvimento embrionário.

Tratamentos Experimentais e Inoculação

Os ovos foram divididos em três tratamentos com oito repetições de 14 ovos cada. As soluções utilizadas na inoculação foram produzidas com glicerol Sigma® ($\geq 99\%$) e solução fisiológica (0.9%) em equipamentos estéreis e capela de fluxo laminar horizontal com intuito de diminuir possíveis contaminações por microrganismos. A solução fisiológica foi utilizada como diluente, sendo os ovos do tratamento sem glicerol inoculados somente com a solução fisiológica.

As diluições foram previamente avaliadas quanto a osmolaridade e pH para que não ultrapassassem 800 Oms ou apresentassem pH menor que 4, o que poderia prejudicar o desenvolvimento embrionário. Sendo que a solução fisiológica base apresentou 308 osmolar e 6 de pH, e a diluição com 6mg/ml de glicerol 360 Osm e 6,25 de pH.

Ao 17º dia de desenvolvimento embrionário os ovos dos tratamentos 0Glic- 17ºd IOF e 6Glic- 17ºd IOF foram retirados da incubadora e levados para a sala de inoculação. A sala foi aquecida a 30°C e as soluções a 37°C para que não houvesse choque térmico para o embrião. Após desinfecção por aspersão de álcool 70% na região da câmara de ar, foi feita perfuração da casca também nessa extremidade, com o auxílio de um furador manual. Pelo orifício, inoculou-se 0,5ml da solução no líquido amniótico do embrião através de agulha estéril sem ponta de 3 cm x 0,3mm conectada a seringa de 1ml. Para observar a posição do embrião e do líquido amniótico foi realizada ovoscopia durante o processo. O tempo de permanência dos ovos na sala de incubação não excedeu 2 horas. No E18 o procedimento de inoculação foi realizado de forma idêntica nos ovos do tratamento 6Glic- 18ºd IOF.

Após a administração da solução os ovos foram transferidos para os nascedouros onde permaneceram até o 21º de incubação em 36,5°C e umidade de 67%.

Nascimento

Para mensuração dos nascimentos precoces ao completar 480 horas de incubação, os nascedouros foram abertos, os animais já eclodidos foram contabilizados e identificados.

Quando os ovos completaram 500 horas de incubação, um pintinho macho de cada repetição foi retirado do nascedouro e eutanasiado para quantificação de retenção de gema, peso de fígado, e coleta de tecidos (fígado e músculo de peito) para análise de glicogênio.

Como padrão de período de incubação, foi considerado 504 horas (21 dias), sendo que completando esse período os nascedouros foram abertos para a retirada de todos animais. A eclodibilidade foi calculada pelo número de pintinhos nascidos em relação aos ovos férteis. As aves que apresentaram umbigo mal cicatrizado e comportamento letárgico não foram utilizadas para o experimento de desempenho. Após pesagem dos pintinhos de cada repetição os animais foram sexados, por meio do empenamento das asas.

Os ovos não eclodidos ao final do 21º dia de incubação foram avaliados para determinação do dia da mortalidade com base no desenvolvimento embrionário.

Avaliação de glicogênio hepático e muscular

O fígado e músculo de peito dos animais abatidos ao nascimento foram coletados para determinação da quantidade de glicogênio hepático e muscular. Os tecidos foram coletados, pesados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, armazenados em freezer (-20°C) e realizada análise de glicogênio segundo metodologia descrita por Hassid e Abrahams (1957).

Avaliação de Desempenho

Após sexagem os pintinhos foram alojados para ensaio de desempenho em gaiolas de 0,98 x 0,45 x 0,50m (c x l x h), equipadas com comedouro e bebedouro tipo calha, até os 7 dias de idade. A ração fornecida as aves foi idêntica para todos os tratamentos e formulada à base de milho e farelo de soja, segundo as exigências nutricionais da fase (Rostagno et al. 2017). O controle ambiental foi realizado segundo recomendações da linhagem.

No alojamento e aos sete dias os animais e a ração presente nos comedouros foram pesados para avaliação do consumo de ração, ganho de peso, e índice de conversão alimentar.

Também, aos 7 dias de idade um animal de cada repetição foi eutanasiado por deslocamento da cervical, para mensuração de peso de fígado e peito.

Delineamento experimental e estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso, para incubação foram utilizados para cada tratamento oito repetições de 14 ovos cada, totalizando 336 ovos incubados. Já para o ensaio de desempenho os animais foram alojados em sete repetições de seis animais cada, totalizando 126 aves.

Os dados coletados foram submetidos à análise de homogeneidade das variâncias (Teste de Bartlett) e normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk). Após verificada a distribuição normal e ausência de dados discrepantes, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e na presença de diferença estatística entre os tratamentos comparadas as médias pelos testes de Scheffe e de Dunnet, utilizando o tratamento sem glicerol (0Glic- 17ºd IOF) como controle, ambos foram avaliados a 5% de probabilidade. Os dados de período de morte embrionária que são não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal Wallis.

RESULTADOS

A eclodibilidade (Tabela 9) não foi influenciada pela inoculação do glicerol no 17º ou 18º dia de incubação, tal como, o período de morte embrionária e o número de animais nascidos precoces ($P=0,525$ e $P=0,720$, respectivamente, resultados não apresentados).

A inoculação de glicerol não apresentou efeito sobre o peso do pintinho ao nascimento (Tabela 10), no entanto, aumentou a absorção da gema tanto administrado em E17 quanto em E18 ($P<0,05$). O peso do fígado ao nascimento (Tabela 10) não foi afetado pela IOF, contudo o glicogênio hepático foi significativamente maior nos animais que sofreram inoculação do glicerol aos 18 dias de desenvolvimento embrionário ($P<0,01$). Contudo, o glicogênio depositado no músculo do peito não variou com a injeção do glicerol ($P=0,668$).

Tabela 9. Eclodibilidade de ovos inoculados com glicerol em diferentes períodos de desenvolvimento embrionário.

Tratamento	Eclodibilidade
0 Glic- 17ºd IOF	81,08%
6 Glic- 17ºd IOF	77,63%
6 Glic - 18dº IOF	82,3%
CV %	12,16
P-value	0,660

Tabela 10. Peso (g), Peso sem saco da gema (g), Peso de Gema (g), Peso de Fígado (g), Glicogênio hepático e muscular (mg/g de tecido) de pintinhos ao nascimento oriundos de ovos inoculados com glicerol em diferentes períodos de desenvolvimento embrionário.

Tratamento	Peso (g)	Peso sem gema (g)	Gema (g)	Fígado (g)	Glicogênio hepático Mg/g fígado	Glicogênio peito Mg/g músculo
0 Glic- 17ºd IOF	42,27	35,37	7,46	0,727	13,60 ^b	6,85
6 Glic- 17ºd IOF	40,85	34,08	6,23*	0,781	11,51 ^b	7,57
6 Glic- 18dº IOF	42,08	35,84	6,24*	0,746	16,84 ^{a *}	6,98
CV %	2,85	3,83	11,92	14,84	14,35	20,40
P-value	0,126	0,125	0,034	0,702	0,001	0,668

Médias na mesma coluna com diferente sobrescrito diferem significativamente pelo Teste de Scheffe ($P < 0,05$).

* Diferentes do tratamento 0 Glic- 17ºd IOF pelo teste de Dunnet.

Tabela 11. Consumo de Ração Médio (CRM), Ganho de Peso Médio (GPM) e Conversão Alimentar (CA) de pintinhos aos 7 dias de idade oriundos de ovos inoculados com glicerol em diferentes períodos de desenvolvimento embrionário.

Tratamento	CRM (g)	GPM (g)	CA	Peito (g)	Fígado (g)
0 Glic- 17ºd IOF	77,3 ^b	61,7 ^b	1,22	11,40	6,04
6 Glic- 17ºd IOF	86,5 ^{ab}	69,7 ^{ab}	1,24	13,05	5,56
6 Glic- 18dº IOF	89,0 ^{a *}	73,8 ^{a *}	1,26	12,72	5,74
CV %	9,58	11,02	5,06	17,01	20,37
P-value	0,035	0,038	0,446	0,443	0,830

Médias na mesma coluna com diferente sobrescrito diferem significativamente pelo Teste de Scheffe ($P < 0,05$). * Diferentes do tratamento 0 Glic- 17ºd IOF pelo teste de Dunnet.

Aos 7 dias de idade das aves, o CRM e o GPM dos animais inoculados com glicerol no E18 foram maiores que aqueles inoculados com a solução controle (Tabela 11), apesar de não haver diferença na conversão alimentar. Não foi observado influência da IOF no peso do fígado e do peito aos 7 dias.

DISCUSSÃO

O glicerol pode ser utilizado como ingrediente na IOF, uma vez que, não demonstrou efeitos negativos sobre os parâmetros de eclodibilidade, morte embrionária após sua administração e precocidade no nascimento.

Contudo, apesar do glicerol ser um substrato para gliconeogênese, a sua administração promoveu aumento da utilização da gema, apresentando menor quantidade de resíduo no saco vitelínico após o nascimento. Isso vai ao encontro de Zhai et al. (2011) que observaram maiores resíduos de gema com a inoculação de diferentes carboidratos. Já, com a inoculação de glicerol Neves et al. (2017) notaram efeito quadrático sobre o peso do saco da gema após o nascimento, com aumento do peso da gema com os níveis crescentes de glicerol.

Apesar do fígado ser o principal conversor de glicerol em glicogênio nos embriões de frango (Sunny, 2008; Berg e Stryer, 2004) a administração de glicerol não influenciou no peso do órgão ao nascimento. Contudo, os pintinhos que receberam inoculação com glicerol no E18 apresentaram maiores reservas de glicogênio hepático após eclosão, superando o tratamento com inoculação no 17º dia de incubação (Tabela 10). Uma vez que, o glicerol é utilizado para a formação de glicogênio hepático (Sunny e Bequete, 2011), o aumento nas reservas energéticas do tratamento 6 Glic- 18dº IOF provavelmente ocorreu pela conversão de glicerol em glicogênio. A partir do E13 o embrião tem grande demanda de glicose para seu desenvolvimento e crescimento, sendo observado aumento na atividade de enzimas gliconeogênicas que aos E17 chegam no seu pico de atividade (Zhai et al. 2011), após isso observa-se aumento das enzimas envolvidas na síntese de glicogênio que chegam ao máximo no 19º dia de incubação (Ballard e Oliver, 1963; Pearce, 1971). Assim, provavelmente os ovos inoculados aos 17º de incubação utilizaram o glicerol para formação de glicose, que foi usada como fonte de energia antes do nascimento, enquanto que os embriões com inoculação aos 18º o converteram mais substancialmente em glicogênio, uma vez que essas vias metabólicas estavam mais ativas, resultando em maiores reservas do açúcar após nascimento.

Como o sangue oriundo do trato digestivo do embrião passa primeiramente pelo fígado (Romanoff, 1960), o glicerol inoculado, após absorvido pelo embrião, provavelmente foi utilizado para glicogênese pelo fígado, onde o glicogênio foi

armazenado. Dessa forma, possivelmente não houve aumento da glicose sérica, o que possibilitaria a armazenagem do açúcar nos músculos.

Quando as reservas de carboidratos do embrião ou neonato são esgotadas, o músculo do peito se torna a principal fonte de aminoácidos para gliconeogênese (Keirs et al., 2002), gerando uma perda protéica indesejada ao pintinho. Apesar do aumento das reservas de glicogênio nos animais inoculados com glicerol no 18º dia de incubação, não foi observado efeito poupador de proteína muscular, sendo que o peso de peito das aves aos 7 dias de idade não foi influenciado pela inoculação de glicerol.

O maior consumo de ração e ganho de peso nos animais inoculados com 6mg/ml de glicerol aos 18 dias de incubação, quando comparados ao tratamento controle, pode estar relacionado com a maior quantidade de glicogênio hepático após o nascimento. O fígado é a única fonte de glicose sérica do momento da bicagem interna até a primeira alimentação do pintinho (Donaldson, 1995), sendo assim, as maiores reservas de açúcar no órgão podem ter contribuído para manter os níveis séricos de glicose durante o tempo entre o nascimento até o alojamento. A maior glicemia, pode ter propiciado a chegada de pintinhos mais ativos no alojamento, os quais consumiram mais água e ração. Rocha et al. (2013) observaram resposta semelhante, com aumento de consumo de ração com a inoculação de doses crescentes de glicerol *in ovo* e efeito quadrático para ganho de peso aos 7 dias.

A administração de 6mg/ml de glicerol em ovos embrionados não demonstrou prejudicar os parâmetros incubatórios avaliados, independente do dia de inoculação. Ainda, a nutrição *in ovo* com glicerol no 18º dia de desenvolvimento embrionário contribuiu para o aumento das reservas de glicogênio após a eclosão e aumentou CMR e GPM dos animais aos 7 dias. Assim, o glicerol parece ser uma substância que traz benefícios quando utilizada na nutrição *in ovo*, melhorando o desempenho zootécnico e com implantação que se encaixa ao programa de manejo já praticado nos incubatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ballard, F. J.; Oliver, I. T. 1963. Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. *Biochimica et biophysica acta*, v. 71, p. 578-588.
2. Berg JM, Tymoczko JL e Stryer L. 2004. *Bioquímica*. 5.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
3. Christensen, V. L., Wineland, M. J., Fasenko, G. M., & Donaldson, W. E. 2001. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. *Poult. Sci.*, 80(12), 1729-1735.
4. Donaldson, W. E. Carbohydrate, hatchery stressors affect poult survival. *Feedstuffs (USA)*, 1995.
5. Hassid, W. Z.; Abraham, S. 1957. [7] Chemical procedures for analysis of polysaccharides. v. 3, pages 34-38.
6. John, T. M.; George, J. C.; Moran Jr, E. T. 1988. Metabolic changes in pectoral muscle and liver of turkey embryos in relation to hatching: influence of glucose and antibiotic-treatment of eggs. *Poultry Science*, v. 67, n. 3, p. 463-469.
7. Keirs, R. W. Peebles, E. D., Hubbard, S. A., & Whitmarsh, S. K. 2002. Effects of supportive gluconeogenic substances on the early performance of broilers under adequate brooding conditions. *Journal of ap. poult. Res* 11(4): 367-372.
8. Mcloughlin, L.; Gous, R. M. 2000. Efecto del tamaño del huevo en el crecimiento pre y post natal de pollitos de engorde. *Avi.Prof.* 18: 24-29.
9. Moran JR, E. T. 2007: Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. *Poult. Sci.* 86: 1043-1049.
10. Neves, D. G., Retes, P. L., Rocha, R. R., Ferreira, L. G., Naves, L. P., Alvarenga, R. R., ... & Zangeronimo, M. G. 2017: Effects of in ovo feeding with glycerol for broilers. *J. of anim. phys. and anim. Nutr.* 101(3): 434-440.
11. Pearce, J. 1971. Carbohydrate metabolism in the domestic fowl. *Proceedings of the Nutrition Society*. v. 30, n. 3, p. 254-259.
12. Rocha, C., Bueno, I. J. M., Carneiro, C. E. O., Barilli, L. N. E., Santos, R. O. F., Maiorka, A., & Dahlke, F. 2013. In ovo feeding of glycerol to broiler chickens. *Annual Aust. Poult. Sci. Symp.* 24: 159-161. (Abstr.)

13. Romanoff, A.L. 1960. The avian embryo; structural and functional development Macmillian, New York, NY.
14. Rostagno, H S, Albino, LFT, Hannas, MI, Donzele, JL, Sakomura, NK, Perazzo, FG, Saraiva, A, Abreu, MLT, Rodrigues, PB, Oliveira RF, Barreto SLT, & Brito CO. 2017. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Viçosa: UFV.
15. Sunny, N. E., & Bequette, B. J. 2011: Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos. *Jo. of ani. sci.*, 89(12): 3945-3953.
16. Sunny, Nishanth Edakulathur. Integrating macronutrient metabolism in developing chicken embryos. 2008. Tese de Doutorado em Fisiologia, Universidade de Maryland.
17. Uni, Z.; Ferket, P. R. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. 2003. US Pat. US 8734837 B2.
18. Zhai, W., Gerard, P. D., Pulikanti, R., & Peebles, E. D. 2011. Effects of in ovo injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings 1 2. *Poult. Sci.*, 90(10): 2134-2143.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A nutrição *in ovo* vem sendo foco de estudos há duas décadas, a técnica visa fornecer nutrientes para a ave o mais cedo possível e auxiliar a maturação do seu trato gastrointestinal, levando para o campo pintinhos de maior qualidade e mais aptos ao aproveitamento da ração ofertada. São inúmeras as substâncias que podem ser utilizadas na alimentação *in ovo*, muitas já testadas e várias por ainda se descobrir, no entanto, o conhecimento da fisiologia embrionária e todo processo que envolve a incubação são necessários para avaliação dos possíveis ingredientes.

O metabolismo energético do embrião sofre mudanças ao longo dos 21 dias de seu desenvolvimento. A glicose utilizada nos primeiros cinco dias de incubação como fonte energética, após o estabelecimento da membrana corionialantóide, dá lugar a β -oxidação dos ácidos graxos da gema, já nos últimos dias de incubação e durante o período de eclosão, os açúcares depositados na forma de glicogênio são responsáveis pela maior parte da energia que o embrião demanda.

O glicerol, presente nos triglicerídeos da gema, é observado como maior precursor de glicogênio hepático nos embriões de frango, tornando-o ingrediente interessante para nutrição *in ovo* quando se busca o aumento nas reservas de energia do embrião.

No presente trabalho observou-se que o glicerol inoculado *in ovo* é convertido em glicogênio pelo embrião de frango contribuindo para maiores reservas do açúcar após a eclosão, principalmente se administrado no 18º dia de incubação. A utilização do glicerol na IOF tanto em E17 quando em E18, também, não prejudicou a eclodibilidade, ou influenciou no nascimento precoce e período de morte embrionária, podendo ser utilizado na indústria avícola.

Contudo, uma grande barreira para a implantação da nutrição *in ovo* nos incubatórios comerciais é a sua adequação ao programa de manejo já utilizado. A administração de glicerol *in ovo* no 18º dia de desenvolvimento embrionário promoveu maior deposição de glicogênio hepático e melhores índices de desempenho quando comparado com a inoculação no 17º dia de incubação. Esse é um resultado muito importante para a implementação do glicerol como ingrediente na IOF, pois ele pode ser administrado no dia em que os ovos são transferidos das incubadoras para os nascedouros, quando ocorre, também, a vacinação *in ovo*, não necessitando adicionar um manejo a rotina do incubatório.

As matrizes pesadas produtoras dos ovos de frangos de corte permanecem um longo período produzindo ovos, podendo chegar a 42 semanas. Com o envelhecer as matrizes passam a aumentar o intervalo entre ovos, produzindo ovos maiores. Também, dentro de um lote de matrizes com mesma idade há diferenças de tamanho e peso nos ovos. O tamanho dos ovos influi no tamanho dos pintinhos, sendo que de ovos maiores nascem pintinhos mais pesados, e essa diferença de peso pode chegar até a idade de abate.

Foi observado no presente estudo que pintinhos de matrizes jovens se beneficiaram com a inoculação de glicerol *in ovo*, apresentando maior consumo de ração e ganho de peso aos 7 dias de idade, que aqueles inoculados com solução controle. Contudo, a progênie de matrizes mais velhas não demonstrou resposta semelhante a administração de glicerol, sem apresentar benefícios no desempenho. Assim, a nutrição *in ovo* com glicerol pode ser uma alternativa para melhorar os resultados de desempenho nos ovos de reprodutoras jovens, buscando diminuir as diferenças com os pintinhos de matrizes mais velhas.

Portanto, o glicerol se mostra um ingrediente interessante para nutrição *in ovo*, sendo passível de adequar-se as práticas dos incubatórios comerciais. Contudo, são necessários mais estudos para avaliar a melhor dose a ser utilizada e seus efeitos até a idade de abate.

7. REFERÊNCIAS

1. ALCROFT, W. M. **Incubation and hatchery practice**. London: Her Majesty's Stationary Office, 1964. 71 p.
2. AL-MURRANI W.K. Effects of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. **British Poultry Science**, v. 23, p. 171-174, 1982.
3. ALVARENGA, R. R. et al. Use of glycerine in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, v. 68, n. 04, p. 637-644, dez 2012.
4. ARRUDA, P V, RODRIGUES, R. C. L. B., FELIPE, MG de A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v. 26, p. 56-62, 2007.
5. BALLARD, F. J. OLIVER, I. T. Glycogen metabolism in embryonic chick and neonatal rat liver. **Biochimica et biophysica acta**, v. 71, p. 578-588, 1963.
6. BARBOSA V. M. **Fisiologia da incubação e desenvolvimento embrionário**. FEP MVZ UFMG. Belo Horizonte, 2011.
7. BERG JM, TYMOCZKO JL & STRYER L.: **Bioquímica**. 5.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2004.
8. BERNARDINO, V. M. P., et al. Content of plasmatic glycerol and activity of hepatic glycerol kinase in broiler chickens fed diets containing different sources and concentrations of glycerine. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 98, n. 2, p. 328-337, maio 2014.
9. BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*—batch and continuous culture studies. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 18-26, jul. 2001.
10. BJoNNES, P. O.; AULIE, ARNFINN; HØIBY, M. Effects of hypoxia on the metabolism of embryos and chicks of domestic fowl. **The Journal of experimental zoology**. Supplement: published under auspices of the American Society of Zoologists and the Division of Comparative Physiology and Biochemistry/the Wistar Institute of Anatomy and Biology, v. 1, p. 209-212, jan. 1986.
11. BRAKE, J. T. Optimización del almacenaje de huevos fértiles. **Avicultura Profesional**, v. 14, n. 6, p. 26-31, 1996.
12. CERRATE, S. et al. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. **International Journal of Poultry Science**, v. 5, n. 11, p. 1001-1007, 2006.

13. CHAN, P. H.; POLLACK, E.; FISHMAN, R. A. Differential effects of hypertonic mannitol and glycerol on rat brain metabolism and amino acids. **Brain Research**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 143-153, nov. 1981
14. CHRISTENSEN, V. L. et al. Egg storage effects on plasma glucose and supply and demand tissue glycogen concentrations of broiler embryos. **Poultry Science**, v. 80, n. 12, p. 1729-1735, dez. 2001.
15. CHRISTENSEN, VERN L.; ORT, DEBBIE T.; GRIMES, JESSE L. Physiological factors associated with weak neonatal poult (Meleagris gallopavo). **International Journal of Poultry Science**, v. 2, p. 7-14, 2003.
16. COLIN, THIERRY, et al. Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Current Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 238-243, out. 2001.
17. COUTTS, AARON, et al. The effect of glycerol hyperhydration on Olympic distance triathlon performance in high ambient temperatures. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 105-119, 2002.
18. DA SILVA, G P; MACK, M; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 30-39, jan/fev. 2009.
19. DAVIS, C.; REEVES, R. High Value Opportunities from The Chicken Egg. A report for the **Rural Industries Research and Development Corporation**. RIRDC Publication. <www.rirdc.gov.au>, 2002.
20. DEEMING, D. C. **Avian incubation: behaviour, environment, and evolution**. Lincoln: Oxford University Press, 2002.
21. DELGADO, R. , et al. Glycerol supplementation enhances the protective effect of dietary FloraMax-B11 against *Salmonella Enteritidis* colonization in neonate broiler chickens. **Poultry science**, p. ps3927, agost. 2014.
22. DHARMADI, Y; MURARKA, A; GONZALEZ, R. Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering. **Biotechnology and bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 821-829, mai. 2006.
23. DONALDSON, W. E. Carbohydrate, hatchery stressors affect poult survival. **Feedstuffs (USA)**, 1995.
24. DOZIER, W. A et al. Apparent Metabolizable Energy of Glycerin for Broiler Chickens. **Poultry Science** College Station. n. 87, p 317-322, 2008.
25. DOZIER, W. A.; KERR, B. J.; BRANTON, S. L. Apparent metabolizable energy of crude glycerin originating from different sources in broiler chickens. **Poultry science**, v. 90, n. 11, p. 2528-2534, Nov 2011.

26. EL SABRY, M. I. et al. Effect of breeder age and lighting regimen on growth performance, organ weights, villus development, and bursa of fabricius histological structure in broiler chickens. **Czech J. Anim. Sci.**, v. 60, p. 116-122, 2015.
27. EVERAET, N.; DECUYPERE, E. Fisiologia do embrião. In: Macari M. et al. **Manejo da incubação**. FACTA, 2013, pg. 31-45.
28. GONÇALVES, F. et al. Nutrição in ovo: estratégia para nutrição de precisão em sistemas de produção avícola. **Archivos de Zootecnia**, Cordoba, v. 62, p. 45-55, sep. 2013.
29. FOYE, O. T.; UNI, Z.; FERKET, P. R. Effect of in ovo feeding egg white protein, β -hydroxy- β -methylbutyrate, and carbohydrates on glycogen status and neonatal growth of turkeys. **Poultry Science**, v. 85, n. 7, p. 1185-1192, jul. 2006.
30. FREEMAN, B. M.; VINCE, M. A. **Development of the avian embryo**. London: Chapman and Hall, 1974. 362 p.
31. FUNDERBUNK, S. et al. Effects of egg size and eggshell conductance on poult livability and body weight gain. **Poultry science**. Vol. 84, pp. 33-33, 2005.
32. GABRIELLI, M. G.; ACCILI, D. The chick chorioallantoic membrane: a model of molecular, structural, and functional adaptation to transepithelial ion transport and barrier function during embryonic development. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, Cairo, v. 2010, p. 1-12, Jan. 2010.
33. GIMENEZ, A. C., RICCARDI, R. R., MALHEIROS, E. B., & BOLELI, I. C.. Influência do sexo e peso dos ovos sobre a altura dos vilos e profundidade das criptas do intestino delgado de embriões e pintos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 608-616, 2008.
34. GUERRA, R. L. D. H., et al. Glicerina bruta mista na alimentação de frangos de corte (1 a 42 dias). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 4, out/dez. 2011.
35. GUYTON, Arthur C. Textbook of Medical Physiology. 8^a ed. WB Saunders Company. **Philadelphia, PA**, 1991.
36. HAMILTON, R. M. G. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. **Poultry science**, v. 61, n. 10, p. 2022-2039, out. 1982.
37. HARA-CHIKUMA, M.; VERKMAN, A. S. Physiology roles of glyceroltransporting aquaporins: the aquaglyceroporins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 63, n. 12, p. 1386-1392, Jun. 2006.
38. HASSID, W. Z.; ABRAHAM, S.: [7] **Chemical procedures for analysis of polysaccharides**. v. 3, p. 34-38, 1957.

39. HAZELWOOD, Robert L. Endocrine control of avian carbohydrate metabolism. **Poultry science**, v. 50, n. 1, p. 9-18, 1971.
40. HÖBER, R; HÖBER, J. Experiments on the absorption of organic solutes in the small intestine of rats. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 10, n. 4, p. 401-422, 1937
41. HOIBY, M; AULIE, A; BJONNES, Per Ole. Anaerobic metabolism in fowl embryos during normal incubation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 86, n. 1, p. 91-94, 1987.
42. HU, Q.; AGARWAL, U.; BEQUETTE, B. J. Energy sensing in developing chicken embryos and posthatch chicks from different size eggs. **Poultry science**, v. 92, n. 6, p. 1650-1654, jun. 2013.
43. HU, Q.; AGARWAL, U.; BEQUETTE, B. J. Gluconeogenesis, non-essential amino acid synthesis and substrate partitioning in chicken embryos during later development. **Poultry science**, v. 96, n. 2, p. 414-424, agos. 2016.
44. HUANG, Ming-Ta; VEECH, R L. Role of the direct and indirect pathways for glycogen synthesis in rat liver in the postprandial state. **Journal of Clinical Investigation**, v. 81, n. 3, p. 872, 1988.
45. HUMPHREY, B D.; RUDRAPPA, S G. Increased glucose availability activates chicken thymocyte metabolism and survival. **The Journal of nutrition**, v. 138, n. 6, p. 1153-1157, 2008.
46. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **A guide to IUPAC nomenclature of organic compounds**. Oxford, 1993. 1330 p.
47. ITO, T., et al. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 260-265, set. 2005.
48. JOHN, T. M.; GEORGE, J. C.; MORAN JR, E. T. Metabolic changes in pectoral muscle and liver of turkey embryos in relation to hatching: influence of glucose and antibiotic-treatment of eggs. **Poultry Science**, v. 67, n. 3, p. 463-469, mar. 1988.
49. JOHN, T. M.; GEORGE, J. C.; MORAN JR, E. T. Pre-and post-hatch ultrastructural and metabolic changes in the hatching muscle of turkey embryos from antibiotic and glucose treated eggs. **Cytobios**, v. 49, n. 198-199, p. 197-210, jan. 1986.
50. KATZ, J.; MCGARRY, J. D. The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism?. **Journal of Clinical Investigation**, v. 74, n. 6, p. 1901, 1984.
51. KEIRS, R. W. et al. Effects of supportive gluconeogenic substances on the early performance of broilers under adequate brooding conditions. **Journal of applied poultry research**, v. 11, n. 4, p. 367-372, dez. 2002.

52. KREBS, H. A. Some aspects of the regulation of fuel supply in omnivorous animals. **Advances in enzyme regulation**, v. 10, p. 397-420, nov. 1972.
53. KORNASIO, R., HALEVY, O., KEDAR, O., & UNI, Z. Effect of in ovo feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. **Poultry Science**, 90(7): 1467-1477, 2011.
54. LAMMERS, P. et al. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 104-107, 2008.
55. LIN, E. C. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 46, p. 765-795, 1977
56. LIN, M. H., ROMSOS, D. R., & LEVEILLE, G. A. Effect of glycerol on lipogenic enzyme activities and on fatty acid synthesis in the rat and chicken. **The Journal of nutrition**, v. 106, n. 11, p. 1668-1677, 1976.
57. LU, J. W.; MCMURTRY, J. P.; COON, C. N. Developmental changes of plasma insulin, glucagon, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryos and hatched chicks. **Poultry science**, v. 86, n. 4, p. 673-683, abr. 2007.
58. MACARI, M. et al. **Manejo de incubação**. 3. ed. Jaboticabal: FACTA, 2013. 468 p, fotografia color., 11,71x9 cm.
59. MAIORKA, A. et al. Effect of broiler breeder age on pancreas enzymes activity and digestive tract weight of embryos and chicks. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 6, n. 1, p. 19-22, 2004.
60. MAIORKA, A. Idade da matriz e qualidade do pintinho. In: Macari M. et al. **Manejo da incubação**. FACTA, 2013, pg. 163-175.
61. MAIORKA, A. et al, H. Effect of Broiler Breeder Age and Glutamine Supplementation on the Development of the Intestinal Mucosa of 7-Day-Old Chicks. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 18, n. 1, p. 17-22, jan/mar. 2016.
62. MALAOU, H.; MARCZAK, R. Separation and characterization of the 1, 3-propanediol and glycerol dehydrogenase activities from *Clostridium butyricum* E5 wild-type and mutant D. **Journal of applied microbiology**, v. 90, n. 6, p. 1006-1014, jun. 2001.
63. MARCHAIM, U.; KULKA, R. G. The non-parallel increase of amylase, chymotrypsinogen and procarboxypeptidase in the developing chick pancreas. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology**, v. 146, n. 2, p. 553-559, Nov. 1967.
64. MATHEWS, C. K.; VAN HOLDE, K. E.; AHERN, K. G. Carbohydrate metabolism I: anaerobic processes in generating metabolic energy. **Biochemistry**, p. 670-703, 1990.

65. MCLEA, L. et al. The effect of glycerol inclusion on broiler performance and nutrient digestibility. **British poultry science**, v. 52, n. 3, p. 368-375, jun 2011.
66. MCLOUGHLIN, L.; GOUS, R. M. Efecto del tamaño del huevo en el crecimiento pre y post natal de pollitos de engorde. **Avicultura Professional**, v. 18, p. 24-29, 2000.
67. MONTNER, P. et al. Glycerol hiperhydration alters cardiovascular and renal function. **Journal of Exercise Physiology**, London, v. 2, n. 1, Jan. 1999. Disponível em: <<https://www.asep.org/asep/asep/jan12c.htm>>. Acesso em: 20 jul. 2016.
68. MORAES, P. O. et al. Effects of the Addition of Pure Glycerin Supplementation in the Drinking Water on the Performance of Broilers Submitted to Heat Stress and Feed Restriction. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas v. 18, n. 3, p. 413-418, jul./set. 2016.
69. MORAN JR, E. T. Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. **Poultry Science**, v. 86, p.1043-1049, 2007.
70. MORAN, Edwin T. Digestion and absorption of carbohydrates in fowl and events through perinatal development. **Journal of Nutrition**, v. 115, p. 665-674, 1985.
71. MURAMATSU, T. et al. Importance of albumen content in whole-body protein synthesis of the chicken embryo during incubation. **British poultry science**, v. 31, n. 1, p. 101-106, 1990.
72. MUSHTAQ, M. M. H. et al. Electrolytes, dietary electrolyte balance and salts in broilers: an updated review on growth performance, water intake and litter quality. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge. v. 69, n. 4, p. 789, dez. 2013.
73. NANGSUAY, A. et al. Development and nutrient metabolism of embryos from two modern broiler strains. **Poultry science**, v. 94, n. 10, p. 2546-2554, 2015.
74. NANGSUAY, A. et al. Effects of breeder age, broiler strain, and eggshell temperature on development and physiological status of embryos and hatchlings. **Poultry science**, v. 95, n. 7, p. 1666-1679, mar. 2016.
75. NANGSUAY, A. et al. Yolk absorption and embryo development of small and large eggs originating from young and old breeder hens. **Poultry science**, v. 90, n. 11, p. 2648-2655, nov. 2011.
76. NELSON, D L.; LEHNINGER, A L.; COX, Michael M. **Lehninger Principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.
77. NELSON, D L.; LEHNINGER, A L.; COX, Michael M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2002. fotografia color. 8,3X5,8 cm.
78. NEVES, D. G., RETES, P. L., ROCHA, R. R., FERREIRA, L. G., NAVES, L. P., ALVARENGA, R. R., ... & ZANGERONIMO, M. G. Effects of in ovo feeding with

glycerol for broilers. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 101(3): 434-440, 2016.

79. O'DEA, E. E., et al. Investigating the eggshell conductance and embryonic metabolism of modern and unselected domestic avian genetic strains at two flock ages. **Poultry science**, v. 83, n. 12, p. 2059-2070, 2004.

80. O'SHEA, Eileen F. et al. Subspecies diversity in bacteriocin production by intestinal *Lactobacillus salivarius* strains. **Gut microbes**, v. 3, n. 5, p. 468-473, ag. 2012.

81. OHTA Y. et al. Effect of Amino Acid Injection in Broiler Breeder Eggs on Embryonic Growth and Hatchability of Chicks. **Poultry Science**, v.78, p.1493-1498, 1999.

82. OLIVEIRA, J. E. Effects of in ovo feeding on turkey embryos development, energy status, intestinal maturation, gene expression and post-hatch development. 200. 316 f. Tese- Graduate Faculty of North Carolina State University, Raleigh, 2007

83. OLIVEIRA, J. E.; UNI, Z.; FERKET, P. R. Important metabolic pathways in poultry embryos prior to hatch. **World's poultry science journal**, v. 64, n. 4, p. 488-499, 2008.

84. OZDOGAN, M. et al. Effect of different levels of crude glycerol on the morphology and some pathogenic bacteria of the small intestine in male broilers. **animal**, v. 8, n. 01, p. 36-42, jan. 2014.

85. PEARCE, J. Carbohydrate metabolism in the domestic fowl. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 30, n. 3, p. 254-259, 1971.

86. PEARCE, J. e BROWN, W.O. **Carbohydrate metabolism**. Academic Press, London, 1971.

87. PEARCE, J. Some differences between avian and mammaeian biochemistry. **International Journal of Biochemistry**, v. 8, n. 4, p. 269-275, 1977.

88. PICARDO, M.; DICKSON, A. J. Hormonal regulation of glycogen metabolism in hepatocyte suspensions isolated from chicken embryos. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 71, n. 4, p. 689-693, 1982.

89. PULIKANTI, R. et al. Physiological relationships of the early posthatch performance of broilers to their embryo and eggshell characteristics. **Poultry science**, v. 91, n. 7, p. 1552-1557, jul. 2012.

90. Retes PL, Clemente AHS, Neves DG, et al. 2017: *In ovo* feeding of carbohydrates for broilers—a systematic review. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 00:1–9. <https://doi.org/10.1111/jpn.12807>

91. ROBINSON, J; NEWSHOLME, E. A. The effects of dietary conditions and glycerol concentration on glycerol uptake by rat liver and kidney-cortex slices. **Biochemical Journal**, v. 112, n. 4, p. 449-453, mai 1969.
92. ROCHA, C., et al. 2013:. In ovo feeding of glycerol to broiler chickens. In *24th Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney, New South Wales, Australia, 17-20 February 2013* (pp. 159-161). Poultry Research Foundation.
93. ROMANO, G. G. et al. Effects of glycerol on the metabolism of broilers fed increasing glycerine levels. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas. v. 16, n. 1, p. 97-105, jan/mar 2014.
94. ROMANOFF, A.L. The avian embryo; structural and functional development Macmillian, New York, NY, 1960.
95. ROSTAGNO, H S, et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos**. Viçosa: UFV, 2007.
96. ROSTAGNO, H S, et al. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos**. Viçosa: UFV, 2017.
97. SANTOS, T.T. Influência da inoculação de ingredientes intra ovo em aspectos produtivos e morfológicos de frangos de corte oriundos de distintos pesos de ovos. **Dissertação (Mestrado)**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. 63 pp, 2007.
98. SAUVAGEOT, N., et al. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. **International journal of food microbiology**, v. 55, n. 1, p. 167-170, mar. 2000.
99. SCHMIDT, J., & ZSÉDELY, E. Importance of glycerol in the nutrition of monogastric Animals: 1. Dietary glycerol for broiler chicken. **Állattenyésztés és Takarmányozás**, v. 59, n. 5/6, p. 457-469, 2010.
100. SEIFERT, C., et al. R.. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. **European journal of biochemistry**, v. 268, n. 8, p. 2369-2378, abr. 2001.
101. SHUCHARDT, U. F.; SERCHELI, R.; VARGAS, M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 9, n. 3, p. 199-210, maio 1998.
102. SILVA, C. L. S., et al. Glycerine derived from biodiesel production as a feedstuff for broiler diets. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 14, n. 3, p. 193-202, jul./set. 2012
103. SIMON, A. Administration og glycerol to broilers in the drinking water. **Landbauforschung Voelkenrode**, Braunschweig, v. 169, p. 168-170, 1996.

104. STRANDBERG, K. L. et al. Glycerol monolaurate inhibits *Candida* and *Gardnerella vaginalis* in vitro and in vivo but not *Lactobacillus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 2, p. 597-601, fev. 2010.

105. STRIGUINI, J. H., et al. "Desenvolvimento do sistema digestório em aves." Disponível em < http://www.cbna.com.br/anais/bd6140b0-a83f-4724-aacc-75dbfe0eedd8/palestras/Palestra_1_Jose_Henrique_Stringhini.pdf.> . Acesso em: 5/11/15.

106. STRYER L, TYMOCZKO JL, BERG JM. Bioquímica. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

107. STURKIE, P. D. **Sturkie's avian physiology**. 5th ed. London: Academic, 1998.

108. SUAREZ, M. E. et al. Effect of strain and age of the broiler breeder female on incubation time and chick weight. **Poultry Science**, v. 76, n. 7, p. 1029-1036, 1997.

109. SUGIMOTO, Y. S.; OHSAKO, S.; et al. Ovalbumin in developing chicken eggs migrates from egg white to embryonic organs while changing its conformation and thermal stability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 11030-11037, 1999.

110. SUNNY, N. E.; BEQUETTE, B. J. Glycerol is a major substrate for glucose, glycogen, and nonessential amino acid synthesis in late-term chicken embryos. **Journal of animal science**, v. 89, n. 12, p. 3945-3953, 2011.

111. SUNNY, Nishanth Edakulathur. Integrating macronutrient metabolism in developing chicken embryos. 2008. Tese de Doutorado em Fisiologia, Universidade de Maryland.

112. SWIATKIEWICZ, S.; KORELESKI, J. Effect of crude glycerin level in the diet of laying hens on egg performance and nutrient utilization. **Poultry Science**, v. 88, n. 3, p. 615-619, mai 2009.

113. TAKO, E.; FERKET, P. R.; UNI, Z. Effects of in ovo feeding of carbohydrates and beta-hydroxy-beta-methylbutyrate on the development of chicken intestine. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 2023-2028, 2004.

114. TALARICO, T. L. et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32, n. 12, p. 1854-1858, dez. 1988.

115. TALARICO, Todd L. et al. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1, 3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 943-948, abr. 1990.

116. TANURE, C. B. G. S. et al. Digestible Threonine Levels in the Starter Diet of Broilers Derived from Breeders of Different Ages. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 17, n. SPE, p. 31-37, dez. 2015.

117. TAZAWA, H., et al. Metabolic responses of chicken embryos and hatchlings to altered O₂ environments. **Respiration physiology**, v. 88, n. 1-2, p. 37-50, jan. 1992.
118. THOMMES, R. C., e J. J. JUST. Endocrine control of yolk sac membrane glycogen levels in the developing chick embryo. I. Glucagon. **Gen. Comp. Endocrinol.** 55:614–623, 1964.
119. TONA, K., et al. Effects of age of broiler breeders on egg quality, hatchability, chick quality, chick weight and chick post-hatch growth to 24 days. **J. Appl. Poult. Res.** 13:10–18, 2004.
120. TOPAL, E.; OZDOGAN, M. Effects of glycerol on the growth performance, internal organ weights, and drumstick muscle of broilers. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 1, p. 146-151, mar. 2013.
121. ULMER-FRANCO, A. M.; FASENKO, G. M.; CHRISTOPHER, EE O.'Dea. Hatching egg characteristics, chick quality, and broiler performance at 2 breeder flock ages and from 3 egg weights. **Poultry science**, v. 89, n. 12, p. 2735-2742, 2010.
122. UNI, Z. et al. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. **Poultry Science**, v. 84, n. 5, p. 764-770, 2005.
123. UNI, Z.; FERKET, P. R. Enhancement of development of oviparous species by in ovo feeding. US Regular Patent US, US 8734837 B2, v. 6, p., 2003. Available from: <https://www.google.com/patents/US8734837>
124. UNI, Z.; FERKET, P.R. Methods for early nutrition and their potential. **World's Poultry Science Journal**. v. 60, p. 101-111, mar. 2004.
125. VERNON, Ri G.; WALKER, D. G. Glycerol metabolism in the neonatal rat. **Biochemical Journal**, v. 118, n. 3, p. 531-536, 1970.
126. VIEIRA, S. L.; MORAN, E. T. Effects of delayed placement and used litter on broiler yields. **The journal of applied poultry research**, v. 8, n. 1, p. 75-81, mar. 1999.
127. VIEIRA, S. L.; MORAN, E. T. Effects of egg of origin and chick post-hatch nutrition on broiler live performance and meat yields. **World's Poultry Science Journal**, v. 55, n. 02, p. 125-142, jun. 1999.
128. VIEIRA, S. L.; MORAN, E. T. Eggs and chicks from broiler breeders of extremely different age. **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 4, p. 372-376, 1998.
129. WANG, A. **The Effects of Different Feeding Program and Inclusion of Glycerol, Glucose or Sucrose in Broiler Starter Diets on Growth Performance and Intestinal Development**. Dissertação (Mestrado em Ciência)- Universidade de Dalhousie, Halifax, Nova Escócia, 2014 .
130. WARNER, J. D. et al. Effect of season, hatch time, and post-hatch holding on glycolgen status of turkey poults. In: **Poultry Science**: POULTRY SCIENCE ASSOC INC, 2006, Savoy, IL, USA. p. 56-57.

131. Willemsen, N H.. et al. Critical Assessment of Chick Quality Measurements as an Indicator of Posthatch Performance, *Poultry Science*, Issue 11: 2358–2366, 2008.
132. WILLIER, B. H. Glycogen synthesis, storage and transport mechanisms in the yolk-sac membrane of the chick embryo. **Wilhelm Roux'Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen**, v. 161, n. 2, p. 89-117, fev. 1968.
133. YADGARY, L.; UNI, Z. Yolk sac carbohydrate levels and gene expression of key gluconeogenic and glycogenic enzymes during chick embryonic development. **Poultry science**, v. 91, n. 2, p. 444-453, fev. 2012.
134. YANG, C. M. et al. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. **Poultry science**, v. 91, n. 9, p. 2121-2129, set. 2012.
135. YU, B. et al. The effects of probiotic *Lactobacillus reuteri* Pg4 strain on intestinal characteristics and performance in broilers. **Asian australasian journal of animal sciences**, v. 20, n. 8, p. 1243, ago. 2007.
136. ZAKARIA, A. H.; MIYAKI, T.; IMAI, K. The effect of aging on the ovarian follicular growth in laying hens. **Poultry Science**, v. 62, n. 4, p. 670-674, 1983.
137. ZHAI, W., GERARD, P. D., PULIKANTI, R., & PEEBLES, E. D. Effects of in ovo injection of carbohydrates on embryonic metabolism, hatchability, and subsequent somatic characteristics of broiler hatchlings 1 2. *Poultry science*, 90(10): 2134-2143, 2011.